



# Rôle de ADAM12 dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse

Michaël Ruff

## ► To cite this version:

Michaël Ruff. Rôle de ADAM12 dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse. Autre [q-bio.OT]. Université de Rennes, 2015. Français. NNT : 2015REN1S063 . tel-01267577

**HAL Id: tel-01267577**

**<https://theses.hal.science/tel-01267577>**

Submitted on 4 Feb 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Michaël Ruff**

INSERM UMR 1085  
IRSET - Institut de Recherche en Santé-Environnement-Travail  
Université Rennes 1

---

**Rôle d'ADAM12 dans la  
Transition  
Epithélio-Mésenchymateuse**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 27 Octobre 2015**

devant le jury composé de :

**Dr. Franck VERRECHIA**

Directeur de Recherche INSERM (DR2)  
Université de Nantes / *Rapporteur*

**Dr. Hervé EMONARD**

Chargé de Recherche INSERM (CR1)  
Université de Reims / *Rapporteur*

**Dr. Carine LE GOFF**

Chargé de Recherche INSERM (CR1)  
Université de Reims / *Examineur*

**Dr. Ulrich VALCOURT**

Maître de conférence (MCU)  
Université de Lyon 1 / *Examineur*

**Dr. Yannick ARLOT-BONNEMAINS**

Directrice de Recherches CNRS (DR2)  
Université de Rennes 1 / *Présidente / Examineur*

**Dr. Nathalie THERET**

Directrice de Recherches INSERM (DR2)  
Université de Rennes 1 / *Directrice de thèse*



# REMERCIEMENTS

---

Parce que le doctorat n'est pas le résultat d'un effort strictement personnel mais celui d'une équipe, je vais commencer par remercier les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier Dominique Lagadic-Gossmann, directrice de l'unité U1085, pour m'avoir accueilli et suivi pendant ces trois années au sein du laboratoire.

Nathalie, je me souviendrai toujours de notre rencontre qui a failli ne jamais arrivée. Nous avons rendez vous à la Fnac de la gare Montparnasse pour un entretien, je suis arrivé avec 30 minutes d'avance mais 1 heure plus tard, tu n'étais toujours pas là. Je décidai alors de rentrer chez moi, usé mentalement depuis 1 an que je cherchais une thèse. Quelques mètres plus loin, je pris finalement mon téléphone pour t'appeler. "Je suis arrivé au point de rendez vous" disais-je. "Moi aussi" me répondis-tu. Et oui, parce qu'il y a deux Fnac à la gare Montparnasse... Tu as été une directrice de thèse parfaite, tu as été disponible pour me guider dans mes travaux de thèse tout en respectant mon autonomie, mes idées et mes interprétations. Ton très grand optimisme et ta ténacité m'ont aidé à supporter les quelques moments difficiles durant cette thèse. Merci aussi pour m'avoir soutenu dans ma formation, notamment en m'ayant permis de partir en congrès à New York, et en m'encourageant dans mes démarches de projets professionnels. Ce fut un plaisir de travailler avec toi et j'espère avoir été à la hauteur de tes espérances... heu je viens de recevoir la correction de la discussion, je crois que ça répond à la question...

J'exprime mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse :

- le Dr. Franck Verrechia et le Dr. Hervé Emonard de me faire l'honneur d'être rapporteurs
- le Dr. Carine Le Goff et le Dr. Ulrich Valcourt pour avoir accepté d'examiner mes travaux
- le Dr. Yannick Arlot-Bonnemains en qualité de présidente du jury



Je remercie également les membres de mon comité de thèse qui ont évalué l'avancement de mes travaux de thèse plusieurs fois au cours de mon doctorat, Jacek Kubiak, mon tuteur, ainsi que Yannick Arlot et Pascal Loyer.

J'exprime également ma sincère reconnaissance à Dominique, qui a largement contribué à mon support technique, notamment pour les constructions plasmidiques et les IP pour ne citer que cela. Je me souviendrai de tes coups de gueule rarement justifiés et de ton franc parlé, mais aussi et surtout de l'implication et l'enthousiasme que tu as fourni pour faire avancer nos projets. Je n'oublierai pas non plus ta capacité incroyable à détecter des erreurs potentielles de tes collègues dans l'espoir de pouvoir réclamer des gâteaux. A ce sujet, je ne me souviens pas avoir pu me régaler avec un gâteau pour le transfert que tu as fait à l'envers... Comme quoi ça arrive même aux meilleurs!

Je tiens à remercier l'ensemble de mon équipe. Georges, tu es la force tranquille de l'équipe, tu as toujours des questions pertinentes et un don pour tirer le positif de tout. Fred, toujours là quand on a besoin d'un service : tu pourras changer mon milieu? passer mes cellules? congeler mes cellules? réparer ceci ou cela? OK. C'est particulièrement important d'avoir des personnes comme toi dans une équipe, surtout quand le thésard qui pourrait t'aider joue la carte de la fainéantise... Ne le prend pas mal Jérémy, je rigole! Je n'oublierai jamais les moments qu'on a passé en culture à chanter ou dire des c..... complètement décalées qui faisaient fuir tout le monde. J'y ai réfléchi et je pense que nous sommes la seule combinaison au monde à pouvoir avoir ce type de relations extravagantes. Dieu soit loué, on n'était pas dans le même bureau. PS : Paris is pathetic. Merci aussi à Sophie, Medjda, Victorien, Jean, à mes stagiaires Fabienne, Grégoire et Morgan ainsi qu'aux autres stagiaires pour leur participation à la vie de l'équipe. Je remercie également Vincent, nouvel arrivant de l'équipe, pour ses remarques très constructives sur mon manuscrit de thèse.

Merci à Franck et à Jacques pour l'aide apportée afin de générer des plasmides et les lignées lentivirales, mais aussi pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Je n'oublie pas non plus Pauline qui m'a souvent dépanné de produits en tout genre et avec qui on avait de longues conversations sur le passé ou l'avenir de la recherche. On doit toujours aller boire une bière ensemble au fait! Je remercie aussi Anthony qui a initié le projet et a participé à ses corrections et son évolution.

Passons maintenant aux collègues de bureau. Dans le rôle de Chuck Norris, l'homme qui sait tout sur tout et un peu plus que tout, j'ai nommé Kévin. Ces 3 années passées à tes côtés n'auront pas été faciles, entre gesticulation, mauvaises blagues et discours incompréhensibles... Je me rappelle encore quand tu avais expliqué le potentiel mitochondriale à un stagiaire de 3<sup>e</sup>. Je me souviens aussi de quelques soirées notamment celle où on avait joué au poker dans un bar en faisant croire qu'on ne connaissait pas les règles et qu'on les avait tous plumés! Je remercie aussi Amélie et Doriane même si elles quittaient pas souvent la paillasse et n'avaient aucun sens de l'humour. Arnaud non plus tu n'as aucun sens de l'humour, je vais finir par croire que mes blagues étaient mauvaises... Merci pour cette dernière année, riche en émotions et en chambrage. Allez chtenbrage et bonne continuation. Bassile, tu auras la lourde tâche de me remplacer mais ça va bien se passer, tu es entre de bonnes mains avec Arnaud! Avec vous deux, je souhaite bon courage à Marie et Claudie que je remercie en passant.

I write a message in english for you Kenji, even if you speak better french than me now because I used "merci" too much times and I want to avoid repetitions. So thank you very much for all, it was nice to have you as a friend in this lab. With you, I could speak in english, drink in bars, bury my boy's life, beat you in karting and bowling and even climb the Gran Paradiso. I wish you the best to succeed in your goals and I am waiting for you to climb the Aconcagua in your country... oups c'est pas en Bolivie en fait!

I keep writing in english for you Manuella because you may speak better english than french... J'ai apprécié ton dynamisme et ta spontanéité, ne change rien. On se fait un diner mercredi soir?

Je dois un grand merci à Brigitte Bardot, non pas pour son dévouement auprès de la cause animale, mais pour son extrême gentillesse, sa disponibilité et son professionnalisme sans faille pour les tâches extra-scientifiques.

Un petit mot pour toutes les personnes que j'ai pu côtoyer et qui ont contribué à la bonne ambiance au sein du laboratoire, Marc, Elodie, Abdullah, Lydie, Eric, Patrick, Laurent, Claudie, Normand, Olivier, Valérie, Marie-Thérèse, Aubin, Michel, Sophie, Sophie, Sophie (je n'ai pas le compte exacte), Florence, Elise,



# TABLE DES MATIERES

---

REMERCIEMENTS.....	3
TABLE DES MATIERES .....	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
LISTE DES TABLEAUX .....	12
ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION GENERALE .....	19
CHAPITRE 1 :	21
TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE ET CANCER	21
I) LES DIFFERENTS TYPES D'EMT	23
1.1) EMT de type 1 - Développement	23
a) EMT primaire	23
b) EMT secondaire et tertiaire	25
1.2) EMT de type 2 - Réparation Tissulaire et Fibrose	26
1.3) EMT de type 3 - Contribution à la progression tumorale	27
a) La cascade métastatique	27
b) L'EMT in vivo : modèles murins	28
c) L'EMT : un processus requis pour la génération de métastases?	29
d) Extravasation	29
e) MET, colonisation et microenvironnement	30
f) L'EMT chez l'homme : exemple du cancer du sein	32
II) LE PROGRAMME EMT	34
2.1) Régulation transcriptionnelle	35
a) Facteurs de transcription SNAIL	36
b) Facteurs de transcription bHLH	36
c) Facteurs de transcription ZEB	37
d) Autres facteurs de transcription	37
2.2) Régulation épigénétique de l'EMT	37
2.3) Régulation post-transcriptionnelle de l'EMT	39
a) MicroRNAs	39
b) Epissage alternatif	41
III) L'EMT DANS LE CANCER : DE L'INVASION MAIS PAS SEULEMENT	43
3.1) Migration et invasion	44
a) Perte de l'intégrité épithéliale	44
b) Structures de migration et d'invasion	46
c) Implication de l'EMT dans la migration et l'invasion	47

3.2) <i>Résistance à la mort cellulaire et à la sénescence</i>	48
a) Résistance à l'apoptose : implication des facteurs de transcription pro-EMT	48
b) Résistance à l'anoïki	49
c) EMT et sénescence cellulaire	51
d) EMT et "oncogene addiction"	52
3.3) <i>EMT et immunosuppression</i>	53
3.4) <i>EMT et chimiorésistance</i>	53
3.5) <i>EMT et cellules souches</i>	54
<b>IV) MECANISMES D'ACTIVATION DE L'EMT INDUITE PAR LE TGFβ</b>	<b>57</b>
4.1) <i>Ligands et récepteurs</i>	57
4.2) <i>Voies de signalisation</i>	59
a) Activation de la voie canonique SMAD	59
b) Voies de signalisation non-SMAD	62
4.3) <i>Coopération avec d'autres récepteurs</i>	65
a) Voie Wnt	65
b) Voie Notch	66
4.4) <i>La Matrice Extracellulaire, un déterminant majeur de la réponse au TGFβ</i>	67
<b>CHAPITRE II :</b>	<b>68</b>
<b>ADAM12, UNE ADAMALYSINE IMPLIQUEE DANS LE CANCER</b>	<b>68</b>
<b>I) LA FAMILLE ADAM</b>	<b>68</b>
<b>II) EXPRESSION GENIQUE D'ADAM12</b>	<b>70</b>
2.1) <i>Expression tissulaire</i>	71
2.2) <i>Régulation transcriptionnelle</i>	72
2.3) <i>Régulation post-transcriptionnelle</i>	74
<b>III) ADAM12, UNE PROTEINE MULTIDOMAINES ET MULTIFONCTIONNELLE</b>	<b>75</b>
3.1) <i>Maturation et trafic intracellulaire d'ADAM12</i>	76
a) Maturation d'ADAM12	76
b) Translocation membranaire en réponse aux intégrines	76
c) Translocation membranaire en réponse aux récepteurs couplés aux protéines G	77
d) Relocalisation d'ADAM12L dans les domaines membranaires spécialisés, podosomes, invadosomes et radeaux lipidiques	77
e) Internalisation constitutive d'ADAM12L	78
3.2) <i>Activité métalloprotéasique d'ADAM12L et d'ADAM12S</i>	79
a) ADAM12 est une métalloprotéase active	79
b) Substrats d'ADAM12	79
3.3) <i>Fonctions indépendantes de l'activité métalloprotéase</i>	82
a) Interaction avec des molécules d'adhésion	82
b) Interaction avec des molécules de signalisation intracellulaire	84
<b>IV) PHYSIOPATHOLOGIE D'ADAM12</b>	<b>85</b>
4.1) <i>Développement</i>	85

4.2) <i>Myogenèse et dystrophie musculaire</i>	86
4.3) <i>Adipogenèse</i>	87
4.4) <i>Physiologie osseuse</i>	88
4.5) <i>Grossesse et pathologies du fœtus</i>	90
4.6) <i>Désordres neurologiques</i>	91
4.7) <i>Hypertrophie cardiaque</i>	93
<b>V) ADAM12 DANS LE CANCER</b>	<b>93</b>
5.1) <i>ADAM12 est surexprimée dans le cancer</i>	93
5.2) <i>ADAM12 est fonctionnellement impliquée dans le cancer</i>	95
5.3) <i>Mécanismes d'action</i>	96
a) Effet sur la prolifération	96
b) Effet sur l'apoptose	96
c) Effet sur la migration et l'invasion	97
d) Effet sur la chimiorésistance	98
4.4) <i>ADAM12S comme marqueur pronostique</i>	98
5.5) <i>Mutations d'ADAM12 dans le cancer</i>	98
<b>OBJECTIFS DE THESE.....</b>	<b>100</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>105</b>
<b>RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....</b>	<b>107</b>
<b>I) RELOCALISATION D'ADAM12L DANS LES RADEAUX LIPIDIQUES</b>	<b>107</b>
1.1) <i>TGFβ et radeaux lipidiques</i>	107
1.2) <i>Interactions fonctionnelles d'ADAM12L avec Rap1</i>	109
1.3) <i>Résultats</i>	111
<b>II) RECHERCHE DE PARTENAIRES POUR ADAM12 AU COURS DE L'EMT</b>	<b>113</b>
3.1) <i>Analyse protéomique globale</i>	114
a) Analyse Ontologique	115
b) Analyse des réseaux d'interaction à l'aide de STRING	118
c) Coexpression des protéines criblées	122
3.2) <i>Interactions physiques et fonctionnelles entre les protéines ADAM12L et le TGFBI</i>	124
a) TGFBI : une protéine matricielle induite par le TGFβ	124
b) Résultats	126
3.3) <i>Interaction d'ADAM12L avec ZO-1 et ZO-2</i>	129
a) ZO1 et ZO2 : composants des jonctions serrées	129
b) ZO-1/2, EMT et cancer	130
c) Résultats : interaction entre ADAM12L et ZO-1	131
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>137</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>147</b>

## ANNEXES..... 179

<i>Annexe 1 : Schéma non exhaustive des fonctions d'ADAM12L et d'ADAM12S potentiellement impliquées dans le cancer.</i>	<i>181</i>
<i>Annexe 2 : Liste des protéines avec un enrichissement supérieur ou égale à 3 dans les immunprécipitats ADAM12L comparativement au contrôle dans les MCF10A surexprimant ADAM12L.</i>	<i>182</i>
<i>Annexe 3 : Autres activités réalisées durant la thèse.</i>	<i>184</i>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Rôles physiologiques et pathologiques du processus d'EMT.	21
Figure 2 : La Transition Epithélio-Mésenchymateuse.	22
Figure 3 : Les différents types d'EMT.	23
Figure 4 : La Gastrulation.	24
Figure 5 : Neurulation et migration de la crête neurale.	25
Figure 6 : La cascade métastatique.	27
Figure 7 : La MET, un processus nécessaire à la colonisation des organes secondaires.	31
Figure 8 : Classification moléculaire des différents sous-types de cancers mammaires.	33
Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans l'EMT.	35
Figure 10 : Les modifications épigénétiques régissent la plasticité des cellules épithéliales et mésenchymateuses.	39
Figure 11 : Régulation de la stabilité des ARNm par les micro-RNA.	40
Figure 12 : Les différents types d'épissage alternatifs.	42
Figure 13 : Perte de l'intégrité épithéliale et acquisition de structures de migration et d'invasion.	45
Figure 14 : Les complexes de polarité régulent l'anoïki en contrôlant les voies de signalisation TGFβ, Hippo et Wnt.	51
Figure 15 : Modèles permettant d'expliquer l'hétérogénéité d'une tumeur.	55
Figure 16 : Latence du TGFβ, activation et signalisation.	58
Figure 17 : Complexité des ligands et récepteurs de la famille TGFβ/BMP.	59
Figure 18 : Structure des protéines SMAD.	60
Figure 19 : Implication de la voie SMAD dans la régulation des gènes de l'EMT.	61
Figure 20 : Voies de signalisation non canoniques du TGFβ.	63
Figure 21 : Interactions fonctionnelles entre les voies SMAD et les voies de Wnt et Notch dans l'EMT.	66
Figure 22 : Classification des métalloprotéases dépendantes du zinc, et structure du domaine catalytique des métalloprotéases.	68
Figure 23 : Organisation multidomaine des métalloprotéases matricielles et des adamalysines.	69
Figure 24 : ADAM12 : Epissage, structure et domaines fonctionnels.	71
Figure 25 : Expression tissulaire d'ADAM12 chez l'humain.	72
Figure 26 : Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle d'ADAM12.	74
Figure 27 : ADAM12 : Structure et Domaines fonctionnels.	75
Figure 28 : Schéma non exhaustif des fonctions d'ADAM12L et d'ADAM12S potentiellement impliquées dans le cancer.	80
Figure 29 : Différents stades de la myogenèse.	86
Figure 30 : Différents stades de l'adipogenèse.	88
Figure 31 : Remodelage du tissu osseux par les ostéoblastes et les ostéoclastes.	89
Figure 32 : Les différents sous-types de lymphocytes CD4+.	92



Figure 33 : Mutations d'ADAM12 retrouvées dans le cancer du sein.	99
Figure 34 : Réseau d'interaction des 14 protéines partenaires d'ADAM12L d'après la base de donnée STRING.	101
Figure 35 : Modèle d'activation de la voie ERK par la Kidins220 et Rap1.	110
Figure 36 : ADAM12L n'active pas et n'interagit pas avec Rap1.	111
Figure 37 : Localisation d'ADAM12L dans les radeaux lipidiques en réponse au TGFβ.	112
Figure 38 : Analyse protéomique des interactants potentiels d'ADAM12L.	115
Figure 39 : Analyse intégrative des annotations ontologiques de type "localisation cellulaire" à l'aide de REVIGO.	117
Figure 40 : Analyse intégrative des annotations ontologiques de type "processus biologique" à l'aide de REVIGO.	117
Figure 41 : Analyse intégrative des annotations ontologiques de type "fonction moléculaire" à l'aide de REVIGO.	118
Figure 42 : Réseau d'interaction des 94 protéines sélectionnées.	119
Figure 43 : Réseau d'interaction des protéines sélectionnées ayant un score CRAPOME inférieur à 10%.	121
Figure 44 : Réseau d'interaction des protéines sélectionnées avec l'ajout de marqueurs majeurs de l'EMT (E-cadhérine (CDH1), N-cadhérine (CDH2) et Vimentine (Vim), SNAIL (SNAI1), SNAIL2 (SNAI2), ZEB1/2, TWIST1 et la Fibronectine (FN1) ).	122
Figure 45 : Structure du TGFBI.	125
Figure 46 : Etude de l'interaction en ADAM12L et TGFBI.	128
Figure 47 : Les jonctions serrées.	129
Figure 48 : Structure des protéines ZO et principaux interactants.	130
Figure 49 : Etude de l'interaction entre ADAM12L et ZO-1 par immunoprécipitation et immunolocalisation dans les cellules MCF10A.	133
Figure 50 : Etude de l'interaction entre ADAM12L et ZO-1 par immunoprécipitation dans les cellules étoilées du foie.	134
Figure 51 : Modèle hypothétique de l'action d'ADAM12L au cours de l'EMT induite par le TGFβ.	144

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : ADAM12 est surexprimée dans de nombreux cancers et est associée à un mauvais pronostic.	94
Tableau 2 : Liste des protéines relocalisées dans les radeaux lipidiques en réponse au TGFβ.	108
Tableau 3 : Liste des protéines avec un enrichissement supérieur ou égale à 3 dans les immunoprécipitats ADAM12L comparativement au contrôle.	114
Tableau 4 : Liste des enrichissements des termes GO selon le processus biologique, la localisation cellulaire et la fonction moléculaire (p-value < 0.05).	116
Tableau 5 : Liste des protéines de notre crible ayant un score CRAPOME inférieur à 10%.	120
Tableau 6 : Tableau de corrélation des 32 protéines du crible, dans 60 lignées cancéreuses provenant de plusieurs organes.	123
Tableau 7 : Liste des effets suppresseurs de tumeur et oncogènes du TGFBI.	126

# ABBREVIATIONS

---

## A

ABCC3	ATP-Binding Cassette, sub-family C, member 3
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADAM12L	A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 12 Long
ADAM12S	A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 12 Short
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motif
ADAMTSL	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motif Like
AJ	Adherens Junction
ALK1	Activin-receptor Like Kinase 1
ARNm	ARN messenger
Arp2/3	Actin-Related Protein 2/3 complex

## B, C

bHLH	homodimeric and heterodimeric basic Helix-Loop-Helix
BMI1	B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1
BMP	Bone Morphogenic Protein
BRCA1/2	BRCA1 Cancer type 1/2 susceptibility protein
CCNB	Cyclin B
Cdc42	Cell Division Control protein 42 homolog
CDK1	Cyclin-Dependant Kinase 1
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CTBP	C-Terminal-Binding Protein

## D, E

DLL 1	Delta-Like 1
Dsh	Disheveled
EA	Epissage Alternatif
EAE	Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
Eph R	Ephrin Receptor
ER	Estrogen Receptor
ERK 1/2	Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2
ESE	Exonic Sequence Enhancer
ESRP1	Epithelial Splicing Regulatory Proteins 1
ESS	Exonic Sequence Silencer
Eve-1	ADAM-binding protein Eve-1

## **F**

FAK	Focal Adhesion Kinase
Fas	Apoptosis-mediating surface antigen FAS
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
Flk-1	Fetal Liver Kinase 1
FLRG	Follistatin-Related Gene
FOXC2	Forkhead box protein C2
FOXP3	Forkhead box protein P3
FT-EMT	Facteurs de Transcription de l'EMT

## **G**

GAP	GTPase-Activating Proteins
GDF	Growth and Differentiation Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GPCRs	G Protein-Coupled Receptor
Grb2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
GSK3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 beta

## **H**

HB-EGF	Heparin-Binding EGF-like Growth Factor
HDAC3	Histone DeACetylase 3
HER2	Human EGF Receptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF1 $\alpha$	Hypoxia Induced Factor 1 alpha
HMLE	Human Mammary Epithelial cell
hnRNP	heterogenous nuclear RiboNucleoProtein
hnRNPA1	heterogenous nuclear RiboNucleoProtein A1
hnRNPM	heterogenous nuclear RiboNucleoProtein-M
HSGAG	Heparan Sulfate GlycosAminoGlycanes
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells

## **I, J, K**

IGFBP3/5	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3/5
IGF-I	Insulin-like Growth Factor 1
IL6	InterLeukine 6
ILK	Integrin Linked Kinase
IP	Immuno-Précipitation
ISE	Intronic Sequence Enhancer
ISS	Intronic Sequence Silencer
JAM	Junctional Adhesion Molecules
JNK	c-Jun N-terminal Kinases

## **L**

LAP	Latency Associated Peptide
LATS	Large Tumor Suppressor kinase
LEF1	Lymphoid Enhancer-binding Factor-1
LHX2	LIM/Homeobox protein
LIM	Lin11, Isl-1 & Mec-3
LLC	Large Latent Complex
LPS	LipoPolySaccharide
LTBP	Latent TGF- $\beta$ -Binding Protein

## **M**

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney epithelial cells
MDR1	MultiDrug Resistance protein 1
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MeCP2	Methyl CpG binding Protein 2
MEK 1/2	MAPK/ERK Kinases 1/2
MET	Mesenchymal to Epithelial Transition
MH1	Mad Homology 1
miRNA	microRNA
MKK4	Mitogen-activated protein Kinase Kinase 4
MMP	Matrix MetalloProteinase
MMTV-Neu	Mouse Mammary Tumor Virus - Neural tumor
MMTV-PyMT	Mouse Mammary Tumor Virus - Polyoma virus Middle T-antigen
mTORC2	mammalian Target Of Rapamycin Complex 2
Myc	Myelocytomatosis oncogene

## **N**

NES	Nuclear Export Sequence
NF1	Nuclear Factor 1
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor-kappa B
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NMuMG	Nontransformed Mouse Mammary Gland epithelial cells
NRAGE	Neutrophin Receptor-interacting melanoma Antigen-encoding Gene homolog
N-WASP	Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

## **O, P**

OIS	Oncogen Induced Senescence
p12-CDK2-AP1	Cyclin-Dependent Kinase 2 Associated Protein 1
p14ARF	p14 Alternative Reading Frame
p16INK4a	p16 Inhibiting cyclin dependent Kinase 4, comprising 4 Ankyrin repeats
PACIN3	Protein kinase C and Casein kinase Substrate In Neurons protein 3
Par6	PARTioning defective 6

PCAF	p300/CBP Associated Factor
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
PKD1	Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diPhosphate
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
P-LAP	Placental Leucine AminoPeptidase
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PR	Progesterone Receptor
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
Prrx1	Paired Related homeobox 1
PTB	Polypyrimidine Tract-Binding protein

## R

Rac1	Ra-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rack1	Receptor for Activated C Kinase 1
RBM35B	RNA Binding Motif proteins
RBP	RNA Binding Protein
RGD	tripeptide Arg-Gly-Asp
RhoA	Ras homology gene family, member A
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA-ISH	RNA In Situ Hybridization
ROCK	Rho associated protein kinase
RORγT	Retinoic acid-related orphan receptor gamma Thymocytes
ROS	Reactive Oxygen Species

## S

S6K1	ribosomal protein S6 Kinase beta-1
SAF-B	Scaffold Attachment Factor-B
SARA	Smad Anchor for Receptor Activation
SCRIP	Scribble
SH3	Src Homology domain 3
ShcA	Src Homology 2 domain-containing-transforming protein C1
SHH	Sonic HedgeHog
shRNA	small hairpin RNA
SLC	Small Latent Complex
SMAD	Small body size Mother Against Decapentaplegic
snRNP	small nuclear RiboNucleoProtein
Sos	Son Of Sevenless
Sox	SR Y-related HMG-box
SR	Serin-arginin Rich

Src	Sarcoma
STAT3	Signal Transducer and Activator of transcription 3
SVMPs	Snake Venom MetalloProteinases

## T

TACE	TNF Alpha Converting Enzyme
TAK1	TGF $\beta$ Activated Kinase 1
TAZ	Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif
TCF	T-Cell specific transcription Factor
TGF	Transforming Growth Factor
Th17	T Helper 17 cell
TIF1 $\gamma$	Transcription Intermediary Factor 1-gamma
TIMP1	Tissue Inhibitor of MetalloProteinases 1
TJ	Tight Junction
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TPA	12-O6 TetradecanoylPhorbol-13-Acetate
TRAF6	TNF Receptor-Associated Factor 6
TSP1	Thrombospondine-1
TSR	ThromboSpondine Repeats
TTTS	Twin-to-Twin Transfusion Syndrome
T $\beta$ RI	TGF $\beta$ Receptor type I

## U, V, Y, Z

UTR	UnTranslated Region
VASP	VAsodilatator-Stimulated Phosphoprotein
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VE-cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
YAP	Yes-Associated Protein
ZEB	Zinc E-Box finger-binding
ZO1	Zona Occludens 1
ZONAB	ZO-1 associated Nucleic Acid Binding protein



## INTRODUCTION GENERALE

---

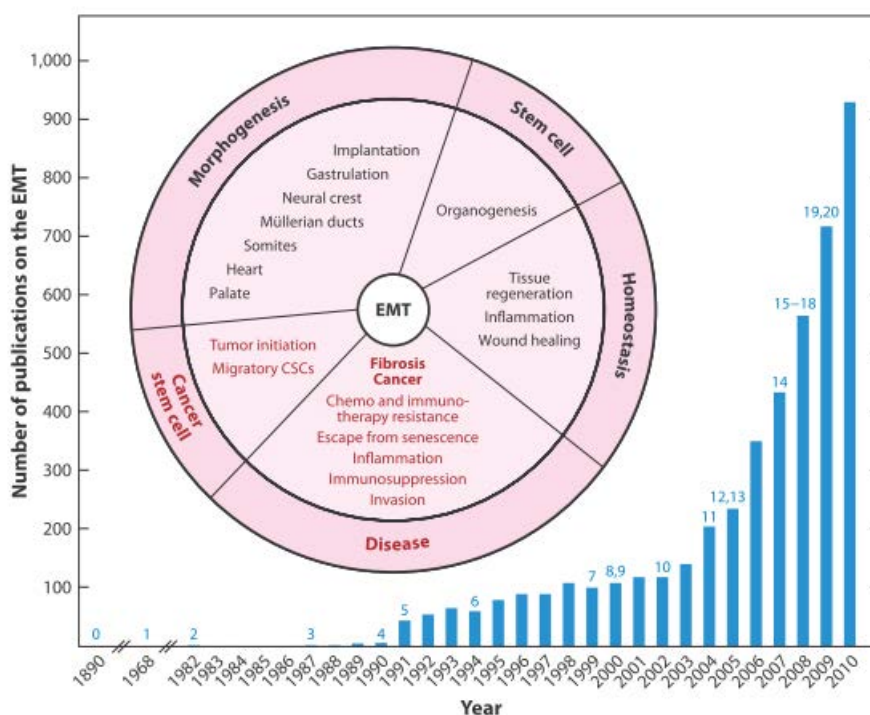




# CHAPITRE 1 :

## TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE ET CANCER

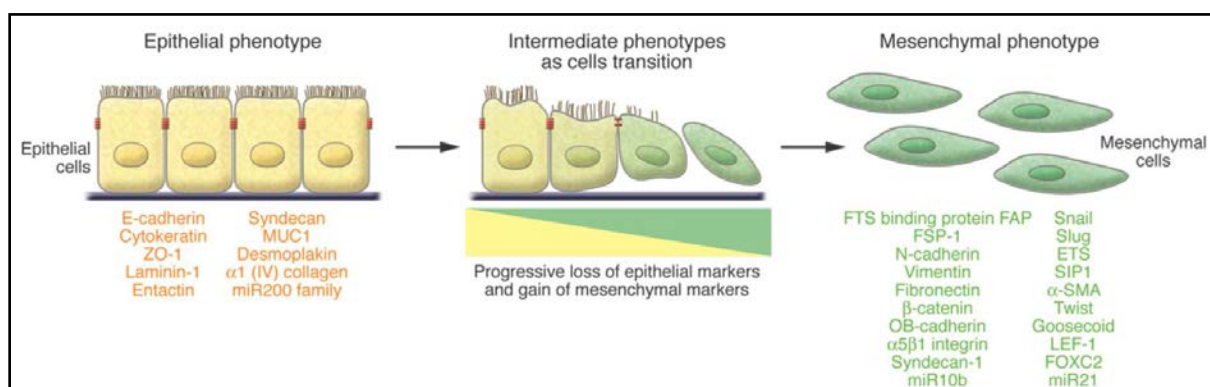
Initialement décrit comme « transformation épithélio-mésenchymateuse » par Elizabeth Hay en 1968, suite à ses observations sur les changements phénotypiques de la ligne primitive des embryons de poussins lors de la gastrulation, ce processus de dédifférenciation est maintenant connu sous le nom de « **transition épithélio-mésenchymateuse** » (**EMT** pour epithelial to mesenchymal transition) soulignant ainsi sa nature réversible. Depuis, le nombre de publications sur l'EMT a considérablement augmenté (**Figure 1** - histogramme bleu). La transition mésenchymato-épithéliale (**MET** pour mesenchymal to epithelial transition) est le processus inverse.



**Figure 1 : Rôles physiologiques et pathologiques du processus d'EMT.**

*Histogramme : Nombre de publications recensées dans pubmed sur l'EMT depuis 1890. Graphique circulaire : Implications physiologiques et pathologiques de l'EMT. L'EMT joue un rôle majeur au cours du développement embryonnaire et de la régénération tissulaire chez l'adulte. Une réactivation anormale du processus d'EMT peut entraîner diverses maladies comme le cancer et la fibrose (Schéma de Nieto, 2011).*

L'épithélium est un tissu très différencié et très organisé. Les cellules épithéliales sont très jointives de par leurs nombreuses jonctions cellulaires et possèdent une polarité apico-basale qui repose sur une matrice extracellulaire (MEC) particulière appelée lame basale. Au cours de l'EMT, les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques épithéliales, les jonctions cellulaires se désassemblent, la polarité apico-basale est perdue, le cytosquelette se réorganise et finalement les cellules acquièrent des marqueurs spécifiques des cellules mésenchymateuses leur conférant des capacités importantes de migration et d'invasion (**Figure 2**).



**Figure 2 : La Transition Epithélio-Mésenchymateuse.**

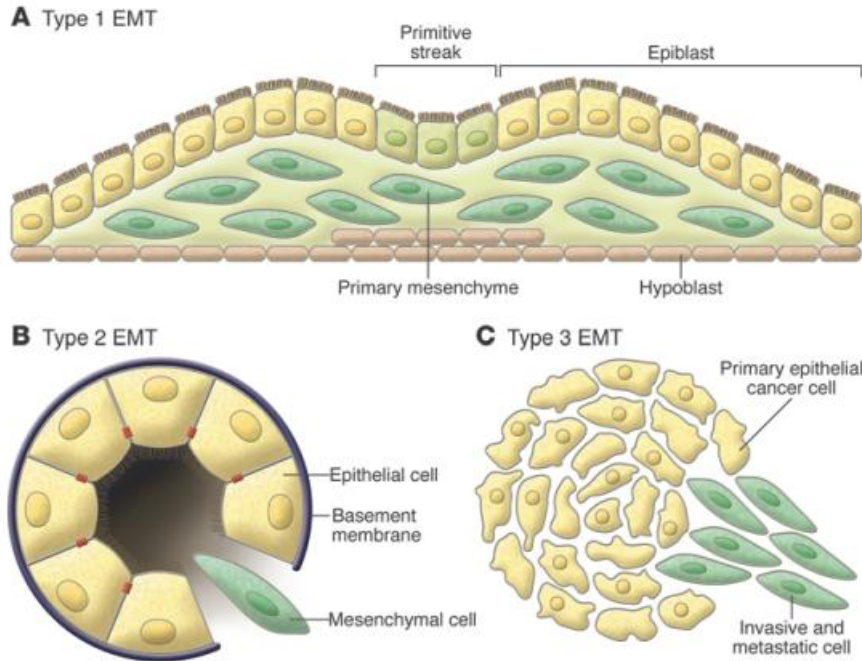
*Au cours de l'EMT, les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques épithéliales et acquièrent progressivement un phénotype mésenchymateux. Cette transition se caractérise par la perte des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine, la Cytokératine et ZO1, accompagnée de l'acquisition de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la Vimentine ou encore la Fibronectine (Schéma de Kalluri and Weinberg, 2009).*

La multiplicité des processus biologiques impliquant l'EMT ont amené les scientifiques à définir 3 sous-types d'EMT qui partagent un certain nombre d'éléments génétiques et biochimiques mais sont liés à des mécanismes physiologiques différents (**Figure 1 et 3**).

L'EMT de type 1 est associée à l'implantation et à la formation de l'embryon, et le développement d'organes.

L'EMT de type 2 est associée à la cicatrisation, la régénération tissulaire et la fibrose.

L'EMT de type 3 est associée aux cellules néoplasiques qui ont déjà subi des modifications génétiques favorisant leur croissance et qui acquièrent les propriétés adéquates à l'invasion des tissus et à la formation de métastases.



**Figure 3 : Les différents types d'EMT.**

*L'EMT a été classée en trois sous-types selon l'implication physiopathologique. L'EMT de type 1 est associée au développement embryonnaire, l'EMT de type 2 est associée à la fibrose et l'EMT de type 3 est associée au cancer (Schéma de Kalluri and Weinberg, 2009).*

## I) Les différents types d'EMT

### 1.1) EMT de type 1 - Développement

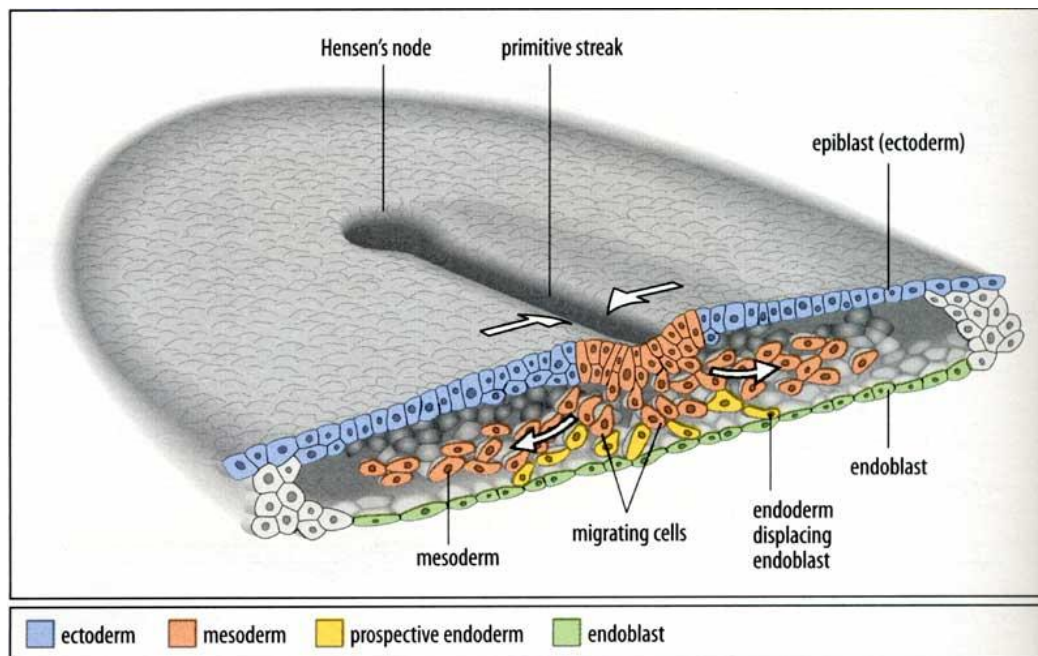
L'EMT est un processus réversible, plusieurs cycles d'EMT et de MET sont nécessaires à la différenciation de types cellulaires spécialisés et à la formation des organes. Ces différents cycles ont été classés selon 3 types : l'EMT primaire comprend notamment la gastrulation et la formation de la crête neurale, l'EMT secondaire regroupe la formation de différents organes dont les somites, le pancréas et le foie, et enfin l'EMT tertiaire aboutit au développement du cœur.

#### a) EMT primaire

##### Gastrulation

La gastrulation est un processus majeur du développement de l'organisme puisqu'elle aboutit à la formation des trois feuillets que sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, et qui donneront naissance aux différents types cellulaires et organes de l'individu (**Figure 4**). Elle détermine par ailleurs les axes de l'embryon en particulier l'axe dorso-ventral. Chez les

amniotes, l'épiblaste, c'est à dire le revêtement de l'embryon, comporte un épaissement appelé ligne primitive vers laquelle migrent les cellules qui délaminent de l'ectoblaste en passant dans un état mésenchymateux. L'invagination des cellules est contrôlée par une région appelée nœud de Hensen chez les mammifères. Ces mécanismes mettent en jeu un réseau complexe de signaux cellulaires et notamment les voies de signalisation Wnt, TGF $\beta$ /BMP et FGF. Les mécanismes de signalisation aboutissent à l'induction de l'expression du facteur de transcription Snail. Ce facteur contrôle négativement l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine et l'ensemble des processus accompagnant l'EMT incluant la perte de polarité, des changements de forme cellulaire ainsi que des capacités de motilité et d'invasion. Des embryons déficients en Snail ne sont pas capables de gastruler, et les cellules du mésoderme ne peuvent pas réprimer la E-cadhérine (Carver et al., 2001; Nieto et al., 1994).



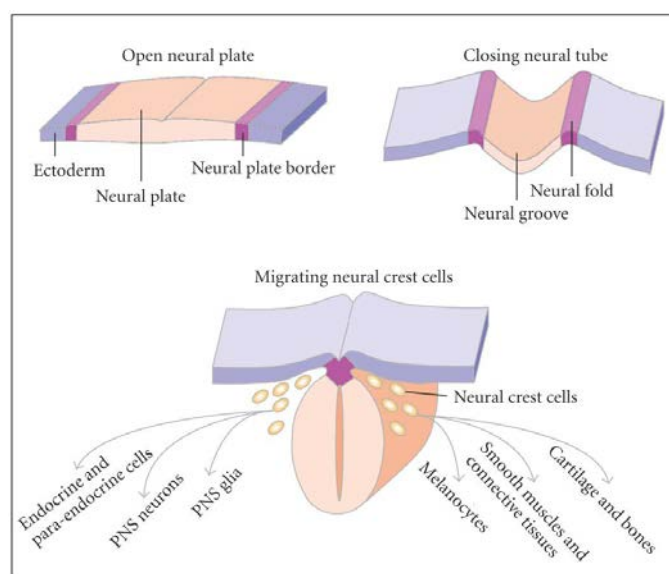
**Figure 4 : La Gastrulation.**

*La gastrulation permet la formation des trois feuillets de l'organisme : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Elle se caractérise par l'invagination de cellules épithéliales ayant subi l'EMT au niveau de la ligne primitive. Schéma de Lewis Wolpert et al, Principles of development.*

### Formation de la crête neurale

La crête neurale commence à se former après la gastrulation, elle donnera naissance aux cellules gliales, à la majorité du système nerveux périphérique, à quelques cellules endocrines, aux mélanocytes et à une grande partie des os et cartilages du squelette facial et du cou. L'EMT est indispensable à la migration de cellules de la plaque neurale vers le milieu de la ligne dorsale, permettant la formation de la crête neurale (**Figure 5**). La formation de la crête

neurale implique les voies de signalisation Wnt, FGF, Notch, l'acide rétinoïque, et un gradient opposé de BMP4 et de ses antagonistes Noggin, Follistatin et Chordin. Ainsi, des voies de signalisation similaires opèrent au cours de la gastrulation et de la formation de la crête neurale. Néanmoins, alors que le défaut d'un seul gène au cours de la gastrulation peut être délétère, l'existence de boucles de régulation de différents inducteurs de l'EMT de la crête neurale explique pourquoi l'absence d'un gène peut être compensée. C'est le cas de Snail dont l'absence empêche le déroulement de la gastrulation alors que les souris mutantes pour Snail1 et Snail2 peuvent toujours générer la crête neurale, malgré de multiples défauts crano-faciaux (Carver et al., 2001; Murray and Gridley, 2006; Nieto et al., 1994).



**Figure 5 : Neurulation et migration de la crête neurale.**

*La crête neurale se forme suite à la migration des cellules de la plaque neurale ayant subies l'EMT vers le milieu de la ligne dorsale. Les cellules de la crête neurale délaminent par la suite et migrent vers les organes périphériques (Schéma de Wislet-Gendebien et al., 2012).*

### ***b) EMT secondaire et tertiaire***

Suite à l'EMT primaire, les cellules mésenchymateuses vont subir des événements de différenciation, au travers du processus de MET, et donner naissance à différents tissus. Le processus de MET est finement contrôlé par la répression de Snail. Puis de nouveau, les cellules vont subir un nouveau cycle d'EMT en réponse à leur microenvironnement pour générer des cellules mésenchymateuses avec un potentiel de différenciation plus restrictif. Le développement du cœur est un cas à part puisqu'il nécessite trois cycles successifs d'EMT et de MET, qu'on appelle EMT tertiaire, et implique les voies de signalisation du TGF $\beta$ , Notch et ErbB ainsi que le facteur de transcription Snail.



## 1.2) EMT de type 2 - Réparation Tissulaire et Fibrose

Dans le contexte de la réparation tissulaire en réponse à une agression, les tissus mettent en place des mécanismes complexes visant à restaurer leur intégrité. Dans l'exemple du modèle de la peau, les kératinocytes doivent migrer au niveau de la blessure. Ils subissent une EMT partielle, aboutissant à un phénotype intermédiaire ou "métastable", leur permettant de migrer tout en conservant les contacts cellulaires. Dans ce contexte, l'expression de Snail2 au niveau du front de migration est primordiale puisque son inactivation ou sa surexpression empêche et accélère respectivement le processus de cicatrisation (Arnoux et al., 2008).

Une réparation anormale ou excessive peut conduire à la fibrose d'organes tels que le foie, le rein ou le poumon. La fibrose se caractérise par une accumulation importante de matrice extracellulaire, notamment de collagènes, dans le parenchyme. Cette MEC constitue alors une barrière empêchant les échanges et la communication entre l'organe et le compartiment sanguin aboutissant à la défaillance de l'organe. Les myofibroblastes jouent un rôle majeur dans la fibrogenèse puisqu'ils constituent la principale source cellulaire productrice de collagène. La majorité des myofibroblastes proviennent d'une transdifférenciation des fibroblastes. Dans le foie, les cellules étoilées hépatiques (fibroblastes) sont activées en myofibroblastes suite à une inflammation et une stimulation par différentes cytokines, notamment le TGF $\beta$ . Cette activation est associée à une modification de leur phénotype, à leur prolifération et à la production d'un grand nombre de facteurs de croissance (dont le TGF $\beta$ ), et surtout, à une sécrétion de composants matriciels et plus particulièrement des collagènes interstitiels (collagène I et III) (Mack and Yanagita, 2015). Cependant, les cellules étoilées ne constituent pas la seule source de myofibroblastes et ceux-ci peuvent aussi provenir de la dédifférenciation de cellules épithéliales via le processus d'EMT que ce soit dans le rein (Iwano et al., 2002), le foie (Zeisberg et al., 2007a, 2007c), et le poumon (Kim et al., 2006). Il a par ailleurs été montré que les cellules endothéliales peuvent subir une EMT (ou EndMT pour endothelial to mesenchymal transition) au cours de la fibrose cardiaque et pulmonaire (Zeisberg et al., 2007b, 2008). En favorisant l'EMT et la génération de myofibroblastes à partir de différents types cellulaires, le TGF $\beta$  est la cytokine majeure impliquée dans la fibrose. Ainsi, de très nombreuses études menées dans différents modèles murins ont montré que l'inhibition de la voie de signalisation du TGF $\beta$  protège de la fibrose (Meng et al., 2015; Saika et al., 2004; Sato et al., 2003; Tan et al., 2006; Zeisberg et al., 2003). Le TGF $\beta$  est l'inducteur majeur de Snail1 qui, surexprimé dans des cellules rénales de souris, est capable d'induire à lui seul une fibrose (Boutet et al., 2006).

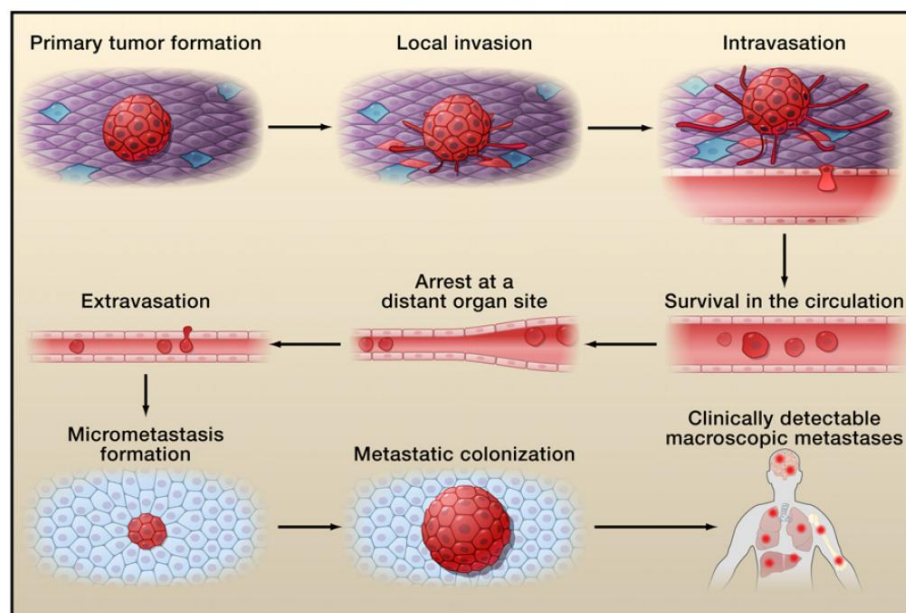
### 1.3) EMT de type 3 - Contribution à la progression tumorale

#### a) La cascade métastatique

Les **métastases** (du grec, déplacement pour meta = prochaine et stasis = place) représentent l'aboutissement d'un processus biologique à plusieurs étapes appelé "cascade métastatique", qui implique la dissémination de tumeurs primaires vers des organes distants et leur adaptation à leur nouveau microenvironnement (**Figure 6**).

La cascade métastatique se compose des étapes suivantes :

- 1- Prolifération incontrôlée des cellules tumorales.
- 2- Envahissement local de la matrice extracellulaire et du stroma environnant.
- 3- Intravasation dans les vaisseaux sanguins.
- 4- Survie dans la circulation sanguine.
- 5- Arrêt au niveau d'organes distants.
- 6- Extravasation dans le parenchyme de l'organe distant.
- 7- Survie dans le microenvironnement étranger de l'organe distant pour former des micrométastases.
- 8- Colonisation métastatique, prolifération et formation de macrométastases.



**Figure 6 : La cascade métastatique.**

*La progression tumorale se fait en plusieurs étapes. La tumeur primaire envahit localement les tissus avant de passer dans la circulation (intravasation). Elle doit ensuite survivre dans le sang, puis s'arrêter au niveau d'un organe distant avant d'atteindre les tissus secondaires (extravasation). Enfin, la tumeur métastatique doit proliférer dans son nouveau microenvironnement (colonisation) (Schéma de Valastyan and Weinberg, 2011).*



La propagation des métastases et leur résistance aux thérapies constituent la principale source d'échec à la lutte contre le cancer puisque ce phénomène est responsable d'environ 90% de la mortalité due aux cancers (Spano et al., 2012; Sporn, 1996). Le processus d'EMT a été proposé pour être un mécanisme majeur de la cascade métastatique, à la fois pour que les cellules cancéreuses s'échappent du site primaire et entrent dans la circulation sanguine, mais aussi pour permettre la survie des cellules dans le sang, leur extravasation et la colonisation des organes distants (Labelle et al., 2011). Par ailleurs, l'EMT pourrait conférer aux cellules des marqueurs et capacités propres aux cellules souches, et générer ainsi des cellules souches cancéreuses (Scheel and Weinberg, 2012).

#### ***b) L'EMT in vivo : modèles murins***

Si le rôle de l'EMT est bien décrit au cours du développement, de la cicatrisation et de la fibrose, sa contribution à la progression tumorale reste encore aujourd'hui controversée. En effet, bien que les processus d'EMT soient largement documentés dans des lignées cellulaires cancéreuses, des preuves convaincantes ont tardé à être publiées sur des échantillons tissulaires. Et pour cause, déterminer la présence d'EMT/MET *in vivo* constitue un obstacle majeur compte tenu de la difficulté à distinguer les fibroblastes du stroma des cellules mésenchymateuses d'origine épithéliale, que ce soit par des approches histopathologiques, immunohistochimiques ou moléculaires.

Les modèles de transplantations syngéniques ou xénogéniques de lignées cellulaires cancéreuses chez la souris ont été largement utilisés pour définir les relations entre EMT et métastases. Néanmoins, bien que ces modèles apportent de nombreuses informations mécanistiques, les conclusions doivent être prises avec précaution car ils ne prennent pas en compte, par exemple, la co-évolution des cellules tumorales et du microenvironnement. Pour les xénogreffes, l'état de différenciation des lignées cellulaires, l'absence d'une réponse immunitaire normale ou encore les incompatibilités potentielles des facteurs de croissance montrent les limites de ce type de modèles.

La première preuve d'existence d'EMT *in vivo* a été apportée dans des expériences de "lineage-tracing" sur des modèles de souris transgéniques de cancer mammaire. En marquant génétiquement les cellules tumorales et en réalisant des analyses d'immunofluorescence, Trimboli et ses collègues ont montré la présence dans la tumeur primaire de cellules tumorales d'origine épithéliale ayant perdu l'expression de la E-cadhérine et exprimant alors la fibronectine (Trimboli et al., 2008). Outre les modèles de cancer du sein, la présence d'une

EMT comme un évènement précoce a aussi été démontrée dans un modèle d'adénocarcinome canalaire du pancréas (Rhim et al., 2012).

### *c) L'EMT : un processus requis pour la génération de métastases?*

S'il est maintenant clair qu'une partie des cellules tumorales peuvent subir l'EMT *in vivo*, cela ne signifie pas qu'elle soit absolument nécessaire à l'invasion des cellules. C'est ce qui a pu être démontré dans deux modèles de cancer du sein (MMTV-Neu et MMTV-PyMT) dans lesquels des métastases ont été détectées alors que l'EMT n'était pas visible, suggérant que l'EMT n'est pas requise pour l'invasivité et les métastases dans le cancer du sein (Trimboli et al., 2008). En accord avec cette étude, il a été montré dans un modèle murin MMTV-Neu que la surexpression du TGF $\beta$  dans des cellules épithéliales augmentait à la fois le grade de la tumeur et la formation de métastases dans le poumon sans toutefois que les cellules de la tumeur primaire ne montrent de marqueurs de l'EMT (Muraoka et al., 2003).

Pourtant, la surexpression des principaux facteurs de transcription impliqués dans l'EMT parmi lesquels SNAIL1/2, TWIST1/2, ZEB1/2, FOXC2, SOX4, TEAD2, et LHX2, induit la formation de métastases dans le cancer du sein montrant un lien entre l'EMT et la formation des métastases.

L'ensemble de ces observations suggère que l'EMT facilite la formation de métastases *in vivo* mais n'est pas le seul moyen dont disposent les cellules pour coloniser d'autres organes. D'autres modes de migration ont d'ailleurs été décrits, notamment la migration de type amibe caractérisée par des projections cytoplasmiques, une absence de contact entre les intégrines et la MEC et l'absence d'un clivage protéolytique de la MEC (Paňková et al., 2010). A noter qu'un phénotype hybride amibe/mésenchymateux a été récemment décrit suggérant une interconnexion des mécanismes d'invasion (Bergert et al., 2012). Il a aussi été proposé que les cellules tumorales puissent s'échapper du site primaire par migration collective, soit des tissus épithéliaux avec une minorité de cellules EMT pour "guider" les cellules épithéliales, soit des tissus mésenchymateux (post-EMT) conservant leurs contacts intercellulaires grâce à la N-cadhérine (Maeda et al., 2005).

### *d) Extravasation*

A l'image des leucocytes qui se rendent sur un site d'inflammation, les cellules cancéreuses doivent adhérer à l'endothélium pour passer à travers et rejoindre l'organe qu'elles coloniseront. Le rôle de l'EMT dans l'extravasation a été clairement montré dans un modèle

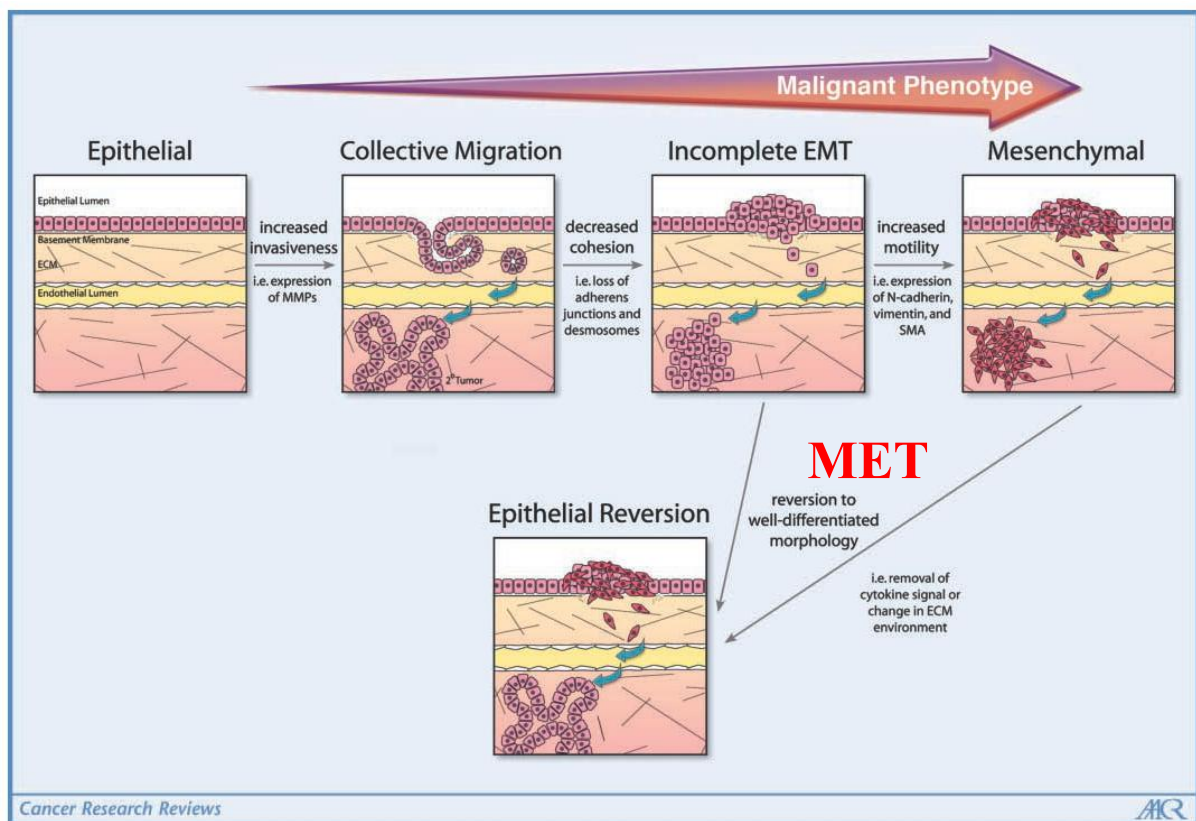
murin où des cellules mésenchymateuses ou épithéliales (+/- Twist) issues d'une tumeur primaire de la peau étaient remises en culture puis réinjectées à la souris par la veine de la queue. Alors que l'extravasation était mesurée à 20% pour les cellules épithéliales, 75% des cellules mésenchymateuses étaient retrouvées à l'extérieur des vaisseaux (Tsai et al., 2012). En accord avec ces résultats, plusieurs études *in vitro* montrent que les cellules ayant subi l'EMT possèdent des molécules d'adhésion favorables à l'interaction avec les cellules endothéliales. Par exemple, certaines intégrines, l'antigène CD44 et la N-cadhérine sont des protéines importantes dans les processus d'extravasation et sont aussi induites au cours de l'EMT (Bill and Christofori, 2015). Le TGFβ, inducteur majeur de l'EMT, est capable d'augmenter la perméabilité des capillaires facilitant ainsi l'extravasation. Par ailleurs, les plaquettes peuvent jouer un rôle important dans l'extravasation en sécrétant du TGFβ favorisant ainsi l'EMT et l'extravasation des cellules cancéreuses (Labelle et al., 2011).

#### *e) MET, colonisation et microenvironnement*

L'un des principaux arguments contre un rôle de l'EMT dans la génération de métastases vient du fait que les cellules tumorales issues de sites de métastases semblent histopathologiquement similaires aux cellules tumorales primaires dont elles sont issues. Pour résoudre cette apparente contradiction, le processus inverse de l'EMT, la MET, a été proposée (Christiansen and Rajasekaran, 2006) (**Figure 7**). Ce mécanisme est bien connu dans le développement de l'individu puisque plusieurs cycles d'EMT/MET sont nécessaires pour former un organe viable, notamment le cœur. De plus, les cellules subissant l'EMT ont un taux de prolifération faible, la MET pourrait leur permettre de proliférer à nouveau et de former des macrométastases.

L'une des premières études sur la MET date de 2006. En utilisant différents clones d'une lignée humaine de carcinome vésical, la lignée parentale ayant un phénotype mésenchymateux et les sous-clones un phénotype épithélial, il a été montré que les clones mésenchymateux étaient plus invasifs lors d'une injection orthotopique comparés aux clones épithéliaux. En revanche, lors d'une injection intracardiaque, le nombre de métastases était plus important pour les clones épithéliaux, suggérant un rôle précoce de l'EMT dans la progression tumorale, alors que la MET aurait un rôle plus tardif (Chaffer et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés par l'équipe d'Angela Nieto qui a montré que l'injection intraveineuse de cellules épithéliales cancéreuses mammaires BT-549 (MET induite par inhibition du facteur de transcription Prrx1) permet la formation de métastases dans les

poumons, contrairement aux cellules mésenchymateuses parentales contrôles (Ocaña et al., 2012). Le rôle de la MET dans la colonisation a été élégamment démontré dans un modèle murin de carcinome squameux spontané dans lequel le gène *Twist1* est inductible à la doxycycline dans les cellules épithéliales de la peau. La doxycycline est injectée soit par voie orale soit au niveau de la tumeur pour provoquer une EMT (induite par *Twist1*) irréversible et réversible respectivement. De façon intéressante, 20% des souris présentent des métastases au niveau des poumons chez les souris contrôles non traitées et les souris traitée par voie orale (EMT irréversible) alors que ce taux monte à 85% lors d'une injection orthotopique (EMT réversible). Dans tous les cas, les cellules au niveau des métastases sont négatives pour *Twist1* suggérant que la répression de *Twist1* (et la MET) est requise pour la colonisation (Tsai et al., 2012).



**Figure 7 : La MET, un processus nécessaire à la colonisation des organes secondaires.**

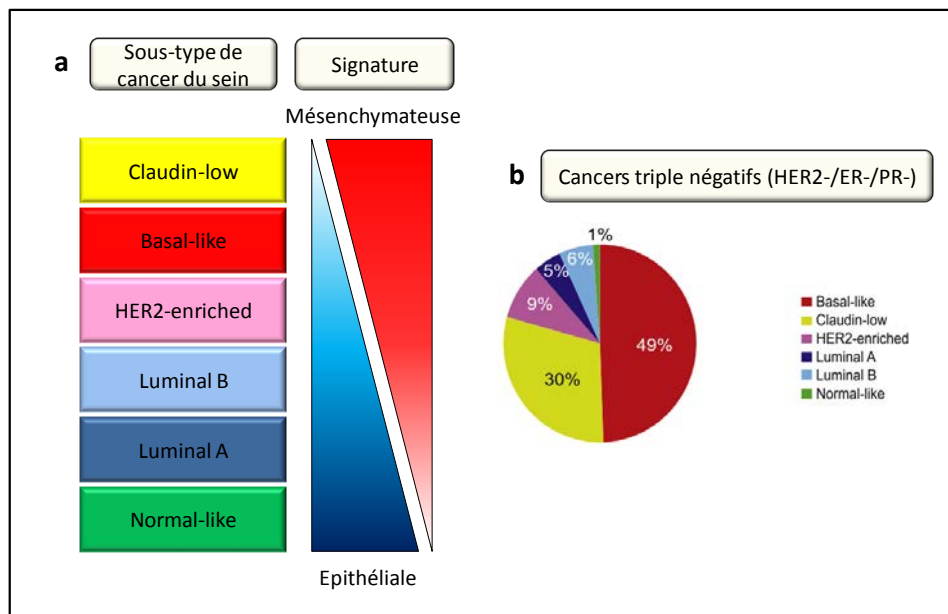
*La colonisation se caractérise par la prolifération de cellules épithéliales cancéreuses au niveau du site de métastase. Ceci implique soit une migration collective des cellules tumorales avec des cellules épithéliales et mésenchymateuses, soit la réversion de cellules partiellement ou complètement mésenchymateuses par le processus de MET (Schéma adapté de Christiansen and Rajasekaran, 2006).*

Une autre hypothèse n'impliquant pas le processus de MET est l'existence d'une EMT partielle caractérisée par une migration collective de cellules mésenchymateuses et de cellules épithéliales (**Figure 7**). Ainsi, les cellules mésenchymateuses localisées au niveau du front de migration conduisent les cellules épithéliales dans la circulation qui vont ensuite être capables de survivre dans le sang et de coloniser les tissus ayant un microenvironnement adéquate. Cette hypothèse est étayée par les travaux de l'équipe de Guo-fu Hu. L'injection sous-cutanée ou intraveineuse de cellules ayant subi l'EMT (transformées par p12-CDK2-AP1) à des souris BALB/c athymiques n'aboutit pas à la formation de métastases, bien que ces cellules soient retrouvées dans la circulation sanguine (Tsuji et al., 2008). En revanche, l'injection des cellules contrôles épithéliales en intraveineuse permet la formation de métastases pulmonaires alors qu'elles n'étaient pas retrouvées dans le sang lors d'une injection sous-cutanée. L'injection sous-cutanée à la fois des cellules mésenchymateuses et épithéliales permet aussi de former des métastases et les deux types cellulaires sont retrouvés dans la circulation sanguine suggérant un rôle de l'EMT dans l'intravasation plutôt que dans la colonisation des organes distants. Cette étude n'écarte néanmoins pas la possibilité d'un rôle de la MET dans le processus de colonisation puisque la surexpression de p12 dans ce modèle bloque les cellules dans l'état mésenchymateux.

#### *f) L'EMT chez l'homme : exemple du cancer du sein*

Pour vérifier la fiabilité des modèles murins de cancer du sein par rapport aux pathologies humaines, des profils d'expression génique de 13 modèles murins ont été comparés avec des patients présentant différents sous-types de cancer du sein. Bien qu'il soit clair qu'aucun modèle murin à lui seul ne puisse refléter un sous-type de cancer mammaire humain, l'analyse a permis d'identifier de nombreuses caractéristiques communes pertinentes (Herschkowitz et al., 2007).

Chez l'homme, les cancers du sein ont été classés selon leur profil d'expression de gènes et 5 sous-types ont été identifiés : luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like, et normal-breast like. Le nouveau sous-type claudin-low a été récemment identifié à partir du groupe basal-like, et présente la signature de type EMT la plus prononcée (**Figure 8**). Les sous-types basal-like et claudin-low correspondent à la grande majorité des cancers dits triples négatifs (TNBC), c'est à dire qui n'expriment pas les récepteurs HER2 (récepteur de l'EGF), PR (progesterone receptor) et ER (estrogen receptor) et ne répondent pas aux traitements hormonaux.



**Figure 8 : Classification moléculaire des différents sous-types de cancers mammaires.**

(a) Les cancers mammaires sont classés sur la base de leur expression génique en six sous-types, normal-like, Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like et claudin-low, du phénotype le moins mésenchymateux au plus mésenchymateux. (b) Les tumeurs Basal-like et claudin-low constituent la majorité des tumeurs triples négatives (schéma adapté de Prat and Perou, 2009).

De façon surprenante, le pronostic vital pour les patients avec le sous-type claudin-low n'est pas plus défavorable que celui des luminal B, Her2-enriched ou Basal-like (Prat et al., 2010). Ces résultats sont d'autant plus surprenants que l'expression importante d'acteurs clés de l'EMT tels que FOXC1, SOX4, LHX2, PRRX1 ou des protéines de la voie TGF $\beta$  dans ces tumeurs sont des facteurs de mauvais pronostic (Kuzmanov et al., 2014; Ocaña et al., 2012; Shipitsin and Polyak, 2008; Taube et al., 2010; Tiwari et al., 2013). En revanche, il a été montré que le sous-type claudin-low était particulièrement plus résistant aux chimiothérapies, comparé aux sous-types luminal A et B alors que le sous-type basal-like reste le plus résistant (Prat et al., 2010). Ceci est à relier à l'observation que les phénotypes mésenchymateux sont intrinsèquement chimiorésistants (Li et al., 2008), et à l'appui de ces observations, une réponse aux thérapies a été négativement corrélée avec une signature EMT (Taube et al., 2010).

Pourquoi certains sous-types de cancers présentent une signature EMT ? Est-ce dû à des altérations génétiques ou épigénétiques aboutissant à une EMT stable, ou est-ce dû à des signaux pro-EMT provenant du microenvironnement ? La nécessité d'une réversion via MET pour la colonisation d'organes distants argumente en faveur de la seconde hypothèse. Cette hypothèse est supportée par le fait que les facteurs de transcription et d'autres gènes pro-EMT

ne sont pas souvent mutés dans les cancers humains ou dans les modèles murins (Bill and Christofori, 2015). A l'inverse, le programme EMT est largement contrôlé par des signaux pro-invasifs dans le microenvironnement, comme l'hypoxie, l'inflammation ou le manque de nutriments. L'origine des cellules claudin-low reste inconnue, mais si elles proviennent de cellules souches mésenchymateuses devenues cancéreuses comme il a été récemment proposé (Prat and Perou, 2011), alors le terme d'EMT serait inapproprié dans ce cas.

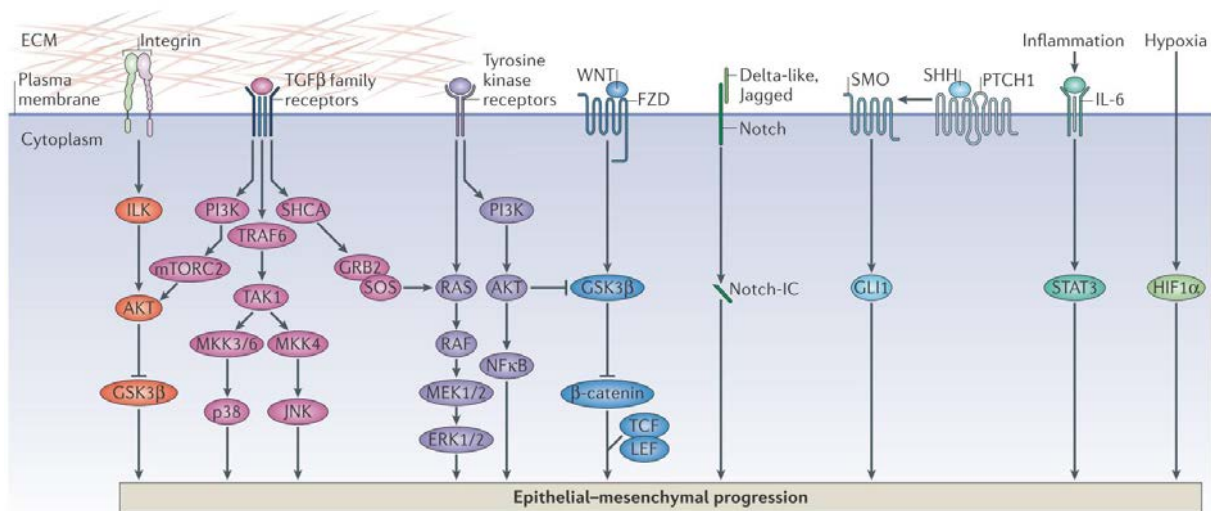
Le système de classification des sous-types de cancer est basé sur leur profil d'expression de gènes, il ne prend donc pas en compte l'hétérogénéité de la tumeur. Les cellules EMT pourraient être minoritaires au sein d'une tumeur, tout en ayant un impact, notamment sur la résistance aux chimiothérapies. La détection de telles cellules par immunomarquage a été rendue difficile à cause de l'absence d'un marqueur spécifique discriminant les cellules mésenchymateuses d'origine épithéliale et les cellules mésenchymateuses stromales. Cette difficulté a été contournée en utilisant une approche d'hybridation *in situ* à ARN (RNA-ISH) sur des tumeurs de type HER2+. Dans cette étude, les auteurs ont identifié des cellules tumorales exprimant des marqueurs mésenchymateux (Yu et al., 2013). En utilisant une approche bi-colorimétrique comprenant une collection de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, cette étude a permis l'identification des cellules exprimant à la fois les marqueurs épithéliaux et les marqueurs mésenchymateux, mais pas nécessairement au niveau du front de migration. De façon intéressante, le plus grand nombre de cellules "doubles positives" a été retrouvé dans les cancers triples négatifs (basal-like et claudin-low très majoritairement), c'est à dire les cancers avec le plus mauvais pronostic. Cette EMT "partielle" identifiée dans les tissus cancéreux pourrait être suffisante pour permettre l'invasion tout en conservant un degré de plasticité permettant une réversion de type MET.

## II) Le Programme EMT

De nombreux ligands extracellulaires activent et maintiennent l'EMT de façon autocrine ou paracrine. Le TGF $\beta$  est un inducteur majeur de l'EMT au cours du développement embryonnaire et de la progression tumorale. La voie Wnt mais aussi les voies associées aux récepteurs à activité tyrosine kinase comme celles de l'EGF, l'HGF, le PDGF ou encore le FGF sont elles aussi capables d'induire l'EMT (**Figure 9**). Ces voies de signalisation aboutissent à des régulations génétiques et épigénétiques qui se font à l'échelle du génome. Des facteurs de transcription "maîtres" régulent positivement ou négativement l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'EMT. La régulation des gènes se fait également par



l'intermédiaire de modifications épigénétiques telles que l'acétylation ou la méthylation, et de l'expression de miRNA qui régulent la stabilité des ARN. De même, certains gènes subissent un épissage alternatif au cours de l'EMT qui peut permettre la synthèse de variants d'épissage dont la fonction peut être différente voire opposée à celle des variants exprimés dans les cellules épithéliales. Ces modifications à large échelle ont donné au processus d'EMT une dimension de "programme" EMT.



**Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans l'EMT.**

La progression de l'EMT est régulée par une multitude de voies de signalisation qui peuvent coopérer pour induire une EMT complète. Ces voies de signalisation sont induites par différents composants du microenvironnement. Le TGFβ induit l'EMT via ses voies de signalisation SMAD et non-SMAD (PI3K, MAPK, RhoA). Ces dernières sont aussi activées par d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase tels que l'EGFR ou le PDGFR et activent l'EMT. Les voies de signalisation de Wnt, Notch et Sonic Hedgehog (SHH) régulent aussi le programme EMT. L'inflammation et l'hypoxie sont aussi des régulateurs de l'EMT à travers l'activation respectivement de Stat3 et de HIF1α. Enfin, les composants de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I induisent l'EMT à travers les intégrines et leur protéine effectrice ILK (integrin-linked kinase) (Schéma de Lamouille et al., 2014).

## 2.1) Régulation transcriptionnelle

Le changement d'expression des gènes au cours de l'EMT est dicté par 3 familles de facteurs de transcription considérés comme des régulateurs "maîtres" de l'EMT : SNAIL, bHLH et ZEB. L'importance relative de ces facteurs de transcription (FT-EMT) varie en fonction du type cellulaire et de leur niveau d'expression dans ces types cellulaires. Ils contrôlent souvent l'expression des uns et des autres et coopèrent fonctionnellement sur les gènes cibles avec d'autres facteurs de transcription. D'une façon générale, leur fonction est à la fois d'inhiber l'expression des gènes épithéliaux et d'induire les gènes mésenchymateux.



#### ***a) Facteurs de transcription SNAIL***

Les facteurs de transcription SNAIL1 (SNAIL) et SNAIL2 (SLUG) activent le programme EMT au cours du développement, de la fibrose et du cancer (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005). Ils répriment les gènes épithéliaux en se liant aux séquences d'ADN de type E-box via leurs domaines C-terminal zinc-finger. L'inhibition par SNAIL de la transcription de la E-cadhérine, protéine épithéliale majeure, a été particulièrement étudiée. Suite à la fixation sur le promoteur proximal du gène de la E-cadhérine, SNAIL1 recrute le complexe répresseur Polycomb 2 (PRC2) qui coordonne la modification des histones, en particulier la méthylation et l'acétylation des histones H3K4, H3K9 et H3K27. La méthylation de H3K9 et de H3K27 induit une conformation inactive de la chromatine tandis que l'acétylation de H3K9 marque une conformation active de la chromatine. Cette action bivalente sur le promoteur de la E-cadhérine est aussi retrouvée sur de nombreux promoteurs et crée ainsi un état d'équilibre prêt à être activé suite à un signal, contribuant à la nature réversible de l'EMT. L'activation de gènes mésenchymateux peut aussi passer par un mécanisme bivalent comme c'est le cas pour le facteur de transcription gooscoïde dont la transcription est induite par une triméthylation répressive de H3K9 et une acétylation activatrice de H3K18 (Xi et al., 2011). De plus, les facteurs de transcription SNAIL peuvent coopérer avec d'autres facteurs de transcription. C'est par exemple le cas de SNAIL1 qui coopère avec ETS1 (dont l'activation dépend des MAPK) pour activer l'expression de métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP). Il coopère aussi avec le complexe SMAD3/4 pour réprimer l'expression de la E-cadhérine suite à un traitement au TGF $\beta$  (Vincent et al., 2009).

#### ***b) Facteurs de transcription bHLH***

Les facteurs de transcription bHLH (homodimeric and heterodimeric basic helix-loop-helix) ont des fonctions majeures dans les phénomènes de différenciation. Parmi eux, TWIST1 et TWIST2 ont des rôles clés dans l'EMT. Dans les cellules cancéreuses, TWIST1 réprime la E-cadhérine tout en induisant la N-cadhérine de façon indépendante de SNAIL mais en collaboration avec d'autres facteurs de transcription (Yang et al., 2012, 2010). Comme pour SNAIL, TWIST régule les modifications de la chromatine en recrutant par exemple la méthyltransferase SET8 responsable de la méthylation de H4K20, conduisant à la répression de la E-cadhérine et l'activation de la N-cadhérine (Yang et al., 2012). De plus, TWIST1 active BMI1 (B lymphoma Mo-MLV), un composant du complexe Polycomb PRC1 et coopère avec BMI1 pour réprimer l'expression de la E-cadhérine et de la protéine inhibitrice

du cycle cellulaire p16/INK4A (Yang et al., 2010). Cette coopération met en jeu le complexe Polycomb PRC2 qui triméthyle H3K27 au niveau du promoteur de la E-cadhérine (Yang et al., 2010).

### *c) Facteurs de transcription ZEB*

Les facteurs de transcription ZEB1 et ZEB2 (zinc E-box finger-binding) peuvent aussi activer et réprimer les gènes de l'EMT en se fixant sur les séquences de type E-box. La répression transcriptionnelle médiée par ZEB passe souvent par le recrutement du co-répresseur CTBP (C-terminal-binding protein) bien que dans certaines cellules cancéreuses, la protéine BRG1 fasse office de co-répresseur (Sánchez-Tilló et al., 2010). Par ailleurs, ZEB1 interagit aussi avec le co-activateur transcriptionnel PCAF (p300/CBP associated factor) et p300, ce dernier passant d'un état de répresseur à activateur transcriptionnel (Postigo et al., 2003).

### *d) Autres facteurs de transcription*

D'autres facteurs de transcription impliqués dans l'EMT ont été récemment identifiés. On peut citer les facteurs de transcription appartenant aux familles FOX (forkhead box), SOX (SRY box) ou encore GATA. Leurs cibles sont comparables à celles des facteurs de transcription "maître" avec lesquels ils peuvent coopérer pour réguler l'expression des gènes de l'EMT.

## **2.2) Régulation épigénétique de l'EMT**

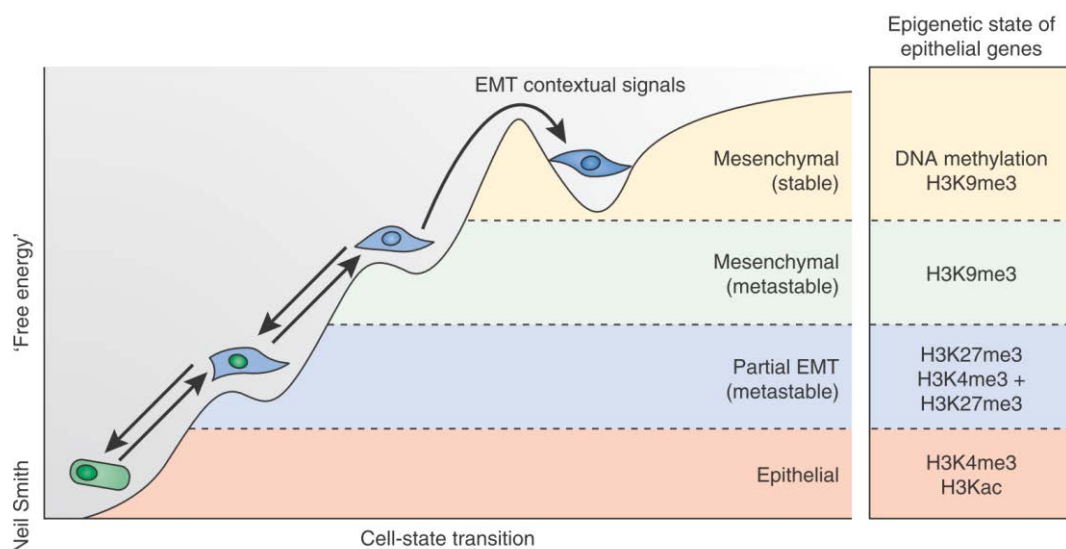
L'EMT est un processus qui se fait en plusieurs étapes passant par des intermédiaires partiellement épithéliaux ou partiellement mésenchymateux. Il a été proposé que le programme de différenciation épithéliale soit un programme par défaut et qu'au contraire, l'état dédifférencié des cellules mésenchymateuses nécessite un signal extracellulaire continu. Par exemple, il a été montré que des cellules épithéliales stimulées au TGF $\beta$  deviennent mésenchymateuses mais réversent rapidement après la fin du traitement. Il existe néanmoins des cellules dans un état mésenchymateux stable qui ne dépendent plus de signaux pro-EMT. C'est notamment le cas des **cellules souches cancéreuses (CSC)** qui possèdent des boucles de régulation autocrines leur permettant de maintenir un phénotype mésenchymateux stable (Scheel et al., 2011).

Ces degrés de différenciation sont dictés par des modifications épigénétiques à l'échelle du génome. Ces modifications gouvernent l'expression de groupes de gènes au cours de l'EMT, en favorisant une conformation ouverte (euchromatine) ou fermée (hétérochromatine) de la

chromatine. Dans les états métastables, c'est à dire les états réversibles, certains gènes sont en position bivalente, ils sont inactifs mais prêts à être activés rapidement en réponse à des signaux de différenciation. Ce type de promoteur bivalent est observé dans certaines cellules cancéreuses qui montrent des caractéristiques proches des cellules souches. Par exemple, dans les cellules épithéliales mammaires humaines enrichies en CD44 (marqueur souche), le promoteur de la E-cadhérine porte les modifications bivalentes H3K4me3 et H3K27me3 et est éteint, tandis que les cellules CD24+, plus différenciées, possèdent uniquement la modification active H3K4me3 et expriment abondamment la E-cadhérine (Maruyama et al., 2011). Cette configuration permet aux cellules CD44+ une rapide différenciation en cellules épithéliales à travers la perte de sa marque répressive H3K27me3 sur le promoteur de la E-cadherine et potentiellement d'autres gènes épithéliaux. A l'inverse, il a été montré que les cellules CD24+ possèdent aussi des gènes bivalents, à l'état inactif, comme Twist et FGF2 alors que les CD44+ portent seulement la modification activatrice, suggérant que les CD24+ sont aussi prêtes à une dédifférenciation rapide en CD44+ (Gupta et al., 2011). Ainsi les gènes bivalents sont dans un état non stable, permissif, et peuvent répondre rapidement et de façon réversible à des signaux contextuels comme les facteurs de transcription associés à l'EMT.

A l'inverse, pendant certaines étapes de l'invasion tumorale, les cellules doivent réprimer leurs gènes épithéliaux sur de longues périodes. Une telle répression stable peut s'expliquer par une triméthylation de l'histone H3K9 qui exerce une répression génique plus importante que la modification H3K27me3. La marque répressive H3K9me3 est particulièrement importante pour maintenir un phénotype mésenchymateux puisqu'elle est requise pour le recrutement d'une ADN méthyltransférase, catalysant la méthylation de l'ADN (Cedar and Bergman, 2009). La méthylation des motifs CpG dans les promoteurs de gène constitue une inhibition stable qui peut perdurer pendant plusieurs cycles cellulaires. Ce type de modification est observé sur le promoteur de la E-cadhérine dans les cellules claudin-low, qui est l'état le plus mésenchymateux dans le cancer du sein (Dong et al., 2012).

L'ensemble de ces observations montre que le programme EMT est une succession de changements passant d'un état épithélial complet à un état mésenchymateux complet et qui est régi par des modifications épigénétiques progressives de plus en plus stables vers le phénotype mésenchymateux. La progression de ces modifications épigénétiques sont résumées dans la **Figure 10**.



**Figure 10 : Les modifications épigénétiques régissent la plasticité des cellules épithéliales et mésenchymateuses.**

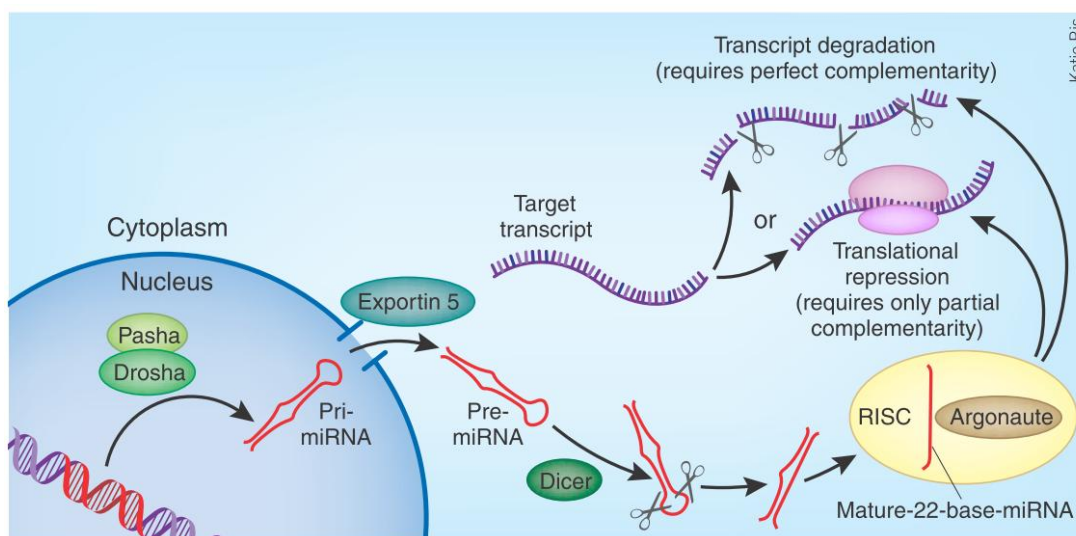
*Le phénotype épithélial est l'état par défaut des cellules épithéliales. Des signaux microenvironnementaux induisent la répression épigénétique de gènes épithéliaux via la modification d'histones qui définissent la plasticité des cellules épithéliales. La stabilité du phénotype mésenchymateux dépend de la présence de signaux pro-EMT et le phénotype est réversé en leur absence à moins que des modifications épigénétiques stables telles que la méthylation de l'histone H3K9 ou la méthylation de l'ADN ne stabilisent le phénotype mésenchymateux des cellules (Schéma de Tam and Weinberg, 2013).*

## 2.3) Régulation post-transcriptionnelle de l'EMT

### a) *MicroRNAs*

Les microRNAs (miRNAs) sont de petites molécules d'ARN non codantes de 20 à 22 nucléotides qui modulent post-transcriptionnellement l'expression de gènes en se liant de manière spécifique aux ARNm cibles au niveau de leur région 3'UTR non codante (**Figure 11**).

La RNA polymérase II transcrit dans le noyau un long précurseur miRNA (pri-miRNA) d'une centaine de nucléotides et contenant une coiffe en 5' et une queue polyA en 3'. Ce précurseur est ensuite processé par la ribonucléase III Drosha en un précurseur miRNA (pré-miRNA) de 70 à 80 nucléotides présentant une structure en épingle à cheveux. Il est ensuite exporté du noyau grâce à l'exportine 5 et clivé par le complexe Dicer qui supprime la boucle et libère un ARN double brin mature de 22 nucléotides. L'un des brins d'ARN se fixe à la protéine Argonaute, constituant ainsi le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui se lie de façon spécifique aux régions 3'UTR de la séquence cible. La spécificité du complexe RISC est donnée par une séquence de 2 à 8 nucléotides dans le miRNA.



**Figure 11 : Régulation de la stabilité des ARNm par les micro-RNA.**

(Schéma de Mack, 2007).

De façon intéressante, les miRNA peuvent réguler leur cible de deux façons différentes. Une complémentarité presque parfaite avec sa cible entraîne une dégradation de l'ARNm cible tandis qu'une complémentarité partielle induit une baisse de la traduction (Pasquinelli, 2012). Ainsi, un même miRNA peut réguler l'expression de plusieurs cibles et contrôler différents processus biologiques.

Les miRNAs ont émergé comme des régulateurs importants de la plupart des processus physiologiques et pathologiques, notamment la formation des métastases, en contrôlant l'EMT.

Il a été montré que l'enzyme de maturation des miRNA, Dicer, est exprimée de façon moindre chez les patients présentant des métastases. De façon intéressante, l'expression de Dicer diminue au cours de l'EMT et cette diminution est corrélée à une diminution globale de l'expression des miRNA (Grelier et al., 2009). Ces données suggèrent que le maintien du phénotype épithélial implique une régulation par les miRNA.

Différentes signatures miRNA ont été associées aux différents sous-types de cancers mammaires. Les TNBC, qui possèdent une signature EMT et CSC marquée, présentent une diminution globale des miRNA (Dvinge et al., 2013). Pour autant, il existe des miRNA dits "oncogènes" et des miRNA dits "suppresseurs de tumeurs". Certains peuvent même avoir ces deux fonctions selon le contexte cellulaire. C'est le cas de miR-9 qui cible directement l'ARNm de la E-cadhérine dans des cellules de cancer du sein alors qu'il cible la voie NFκB-SNAI1 augmentant ainsi l'expression de la E-cadhérine dans des mélanomes (Liu et al., 2012; Ma et al., 2010).

Si les miRNA sont capables de réguler directement l'expression des marqueurs de l'EMT, ils sont aussi impliqués de façon indirecte en régulant l'expression des facteurs de transcription régulateurs de l'EMT. On peut par exemple citer la famille miR-200 (miR-200f) qui cible Zeb1 et Zeb2 sur 9 séquences cibles (Christoffersen et al., 2007). L'inhibition de ZEB1 dans des cellules cancéreuses mésenchymateuses augmente l'expression de miR-200f, résultant en une boucle d'auto-régulation négative. Une autre cible de miR-200f est SUZ12, un composant du complexe PRC2. Les modifications épigénétiques résultantes aboutissent à la répression de la E-cadhérine et l'induction de ZEB1/ZEB2 soulignant encore une fois les rôles ambivalents que peuvent avoir les miRNA (Iliopoulos et al., 2010). Le même type de boucle de régulation négative existe entre le miR-34 et le FT-EMT SNAIL1.

### *b) Epissage alternatif*

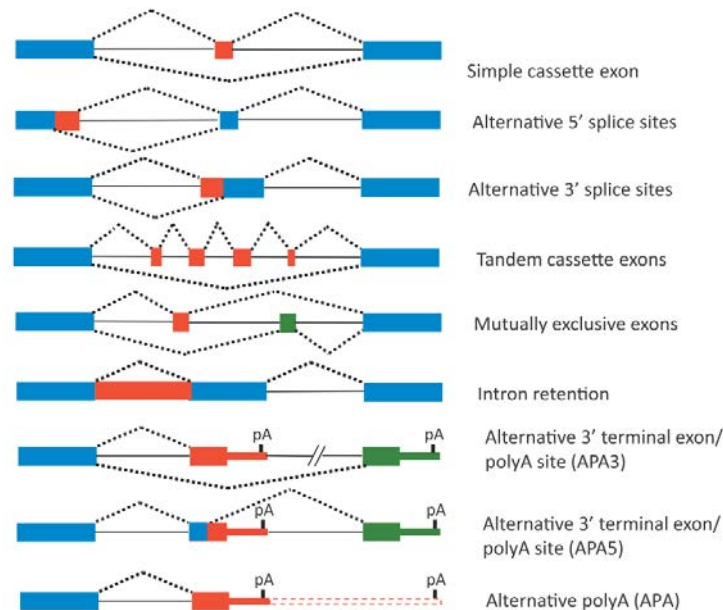
L'épissage alternatif (EA) ajoute un degré supplémentaire de régulation au cours de l'EMT. Il s'agit d'un mécanisme majeur permettant de produire une grande diversité d'acteurs protéiques à partir d'un génome "limité". L'importance physiologique de l'EA a pu être démontrée puisqu'il est régulé de façon dépendante du type cellulaire et tissulaire, à différents stades du développement ou en réponse à des stimuli extracellulaires et l'activation de voies de signalisation spécifiques (Nilsen and Graveley, 2010).

Les différents types d'EA communément observés sont représentés **Figure 12**. Ainsi, les exons peuvent être inclus ou exclus, seuls ou plusieurs à la fois (en tandem), certains sont mutuellement exclusifs tandis que d'autres peuvent aboutir à la présence d'un site de polyadénylation précoce, raccourcissant ainsi de manière drastique la taille de l'ARNm. Par ailleurs, un changement de l'extrémité 3'UTR dans l'ARNm le soumet à des régulations différentielles par les miRNA et/ou des protéines de liaison, qui régulent la stabilité des ARNm via cette extrémité.

L'épissage est réalisé par un complexe macromoléculaire appelé spliceosome, composé de 5 petites ribonucléoprotéines (snRNPs) et d'une centaine de protéines supplémentaires (Jurica and Moore, 2003). L'épissage basal des exons nécessite la présence de séquences consensus au niveau des sites 3' et 5' d'épissage. Le site 3' d'épissage faisant la jonction intron/exon se caractérise par un dinucléotide AG à la fin de l'intron, précédé par une séquence riche en pyrimidine (cytosine, thymine, uracile). Par ailleurs, le site d'épissage 3' possède une séquence appelée "point de branchement" (branchpoint) située 20 à 40 nucléotides en amont. Le site 5'



d'épissage (liaison exon/intron) possède une séquence de 9 nucléotides au début de l'intron commençant par le dinucléotide GU qui est invariant.



**Figure 12 : Les différents types d'épissage alternatifs.**

(Schéma de Warzecha and Carstens, 2012)

Plus les séquences d'épissage seront proches des séquences consensus, mieux ces séquences seront reconnues par le spliceosome et plus l'épissage sera efficace.

Comme pour la régulation transcriptionnelle, l'épissage peut-être influencé par des séquences inhibitrices et activatrices. Celles-ci peuvent être localisées dans les introns, et sont alors nommées intronic splicing silencers (ISS) et intronic splicing enhancers (ISE), ou dans les exons où elles sont nommées exonic splicing silencers (ESS) et exonic splicing enhancers (ESE). Ces séquences sont des sites de fixation pour des protéines de liaison aux ARN (RNA binding proteins ou RBP). Parmi ces protéines, les hnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoproteins) et les protéines SR (serin-arginin rich) interagissent avec la machinerie basale d'épissage pour activer ou bloquer les processus d'épissage.

La présence différentielle de certains variants d'épissage dans les cellules épithéliales et mésenchymateuses a permis d'identifier plusieurs gènes dont l'épissage était modifié au cours de l'EMT (Warzecha and Carstens, 2012) comme le FGFR2 (Fibroblast growth factor receptor 2), CD44, p120-catenin et Mena. De nombreux facteurs ont été identifiés pour influencer l'épissage de FGFR2 (PTB, Tia1/TIAR, Fox2, hnRNPM, hnRNPA1), cependant ces facteurs sont ubiquitaires et ne peuvent expliquer une régulation spécifique de l'épissage de FGFR2 (Baraniak et al., 2006; Hovhannisyan and Carstens, 2007). Grâce à un crible d'expression d'ADNc sur l'ensemble du génome, les protéines RBM35A et RBM35B (RNA

binding motif proteins) ont été identifiées pour favoriser l'EA du gène FGFR2 (Warzecha et al., 2009). L'expression de ces deux gènes dans des lignées cellulaires et des tissus murins a révélé une spécificité pour les cellules épithéliales. De même, l'induction de l'EMT par une transfection stable de Twist1 dans les HMLE (human mammary epithelial cell) diminue dramatiquement l'expression de ces deux protéines, renommées ESRP1 et ESRP2 (epithelial splicing regulatory proteins 1 et 2). Dans l'exemple bien caractérisé des lignées tumorales mammaires, il a été possible de classer les différents sous-types selon une signature de l'épissage alternatif (Lapuk et al., 2010). Les résultats obtenus sont très similaires à ceux obtenus pour la classification des sous types selon l'expression génique effectuée par Neve (Neve et al., 2006). Ce résultat était prédictible puisque les lignées claudin-low expriment moins d'ESRPs comparées aux lignées luminales et basales-like (Neve et al., 2006).

Les nouvelles approches de RNAseq ont récemment permis l'identification et la quantification à haut débit des différents variants d'EA, donnant une vue plus précise et plus générale de la diversité de ces variants. De façon intéressante, les gènes dont l'épissage alternatif est affecté et les gènes qui diffèrent par leur expression, ont des fonctions différentes soulignant un autre degré de régulation du processus d'EMT. Ainsi les gènes dont l'expression est affectée ont plutôt un rôle dans le métabolisme et les voies de signalisation contrôlant la prolifération, les gènes alternativement épissés jouant quant à eux un rôle dans le guidage axonal, la signalisation liée aux intégrines et au récepteur ephrin, la formation des jonctions serrées et la réorganisation du cytosquelette d'actine (Lapuk et al., 2010). L'expression ectopique des ESRPs dans des cellules mésenchymateuses ou l'inhibition par siRNA dans des cellules épithéliales est suffisante pour induire les marqueurs du phénotype inverse et est corrélée avec les capacités d'invasion de ces cellules (Horiguchi et al., 2012a; Shapiro et al., 2011).

L'ensemble de ces études montre un rôle primordial des événements d'épissage alternatif au cours de l'EMT. La signature d'épissage pourrait servir à identifier le type cellulaire d'une tumeur (épithélial, mésenchymateux ou intermédiaire) et aider au diagnostic d'agressivité des cancers. Par ailleurs, l'un des défis à venir sera de déterminer les fonctions précises des différents variants d'une même protéine et leur impact au cours de l'EMT.

### **III) L'EMT dans le cancer : de l'invasion mais pas seulement**

Nous avons vu dans la partie précédente comment l'expression des gènes et des protéines de l'EMT pouvait être régulée. La perte des marqueurs épithéliaux et le gain de marqueurs mésenchymateux confèrent à la cellule des propriétés importantes pour la progression



tumorale, en particulier des capacités de migration et d'invasion. Néanmoins, les caractéristiques des cellules ayant subi l'EMT ne se limitent pas à cela. En effet, elles sont aussi capables de résister à la mort cellulaire induite par le système immunitaire, aux thérapies anti-cancéreuses ou simplement à un microenvironnement non favorable. Par ailleurs, l'acquisition des caractéristiques mésenchymateuses semble être en étroite relation avec les propriétés des cellules souches. Nous discuterons dans cette partie des mécanismes moléculaires permettant aux cellules EMT de progresser dans la cascade métastatique.

### **3.1) Migration et invasion**

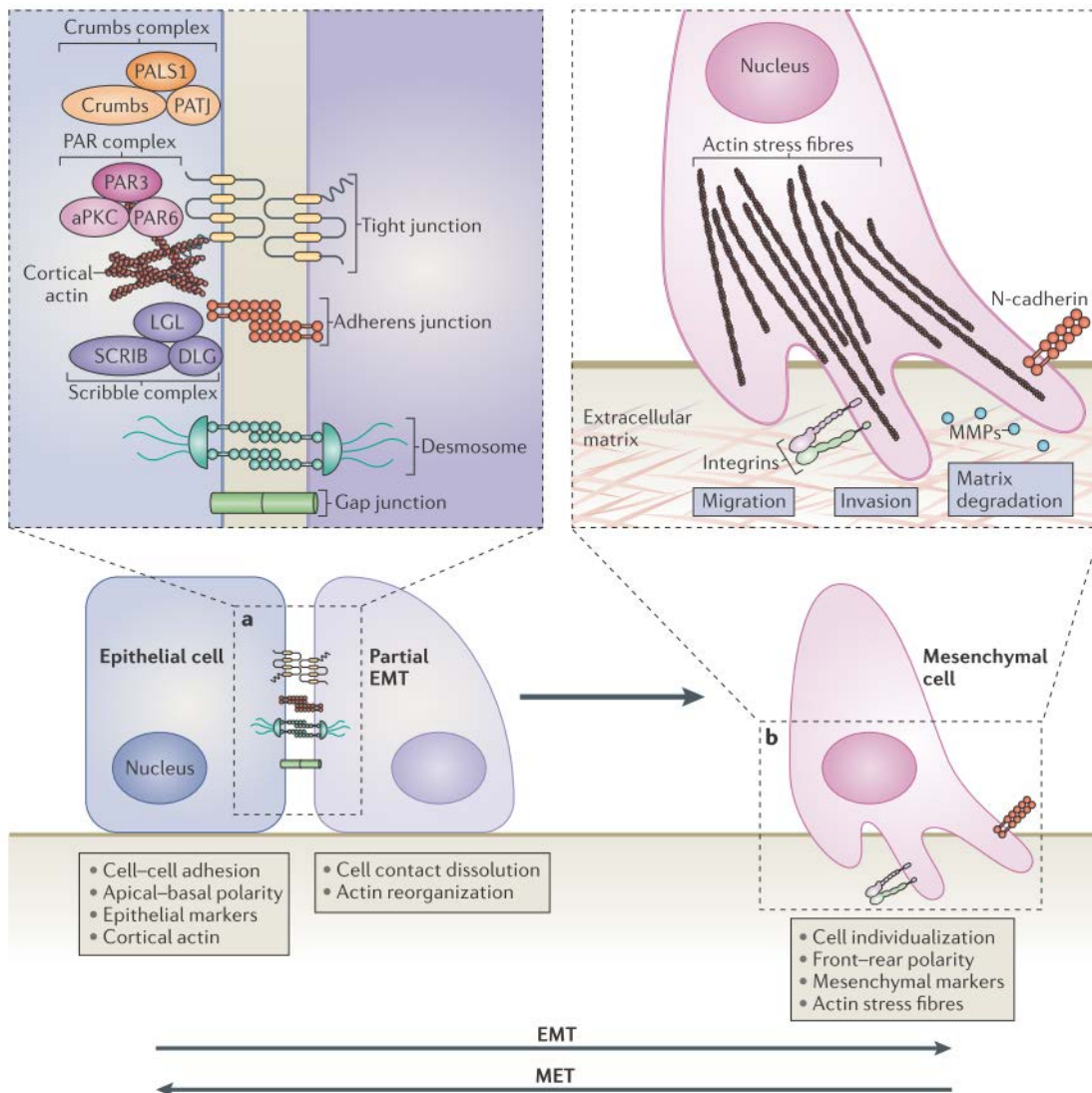
La capacité des cellules à migrer et à envahir les tissus nécessite la perte de l'intégrité de l'épithélium, caractérisé par un désassemblage des jonctions intercellulaires, associé à une perte de la polarité apico-basale. De plus, les cellules ont besoin de créer des structures spécialisées de migration et d'invasion. Ces structures membranaires peuvent être de différents types, on différencie ainsi les lamellipodes, les filopodes et les invadopodes (ou invadosomes).

#### ***a) Perte de l'intégrité épithéliale***

Des complexes protéiques de surface spécialisés forment des jonctions cellule-cellule pour maintenir l'intégrité de l'épithélium. Il s'agit des jonctions serrées au niveau subapical, des jonctions adhérentes, des desmosomes et des jonctions Gap au pôle latéro-basal des cellules (**Figure 13**). Lors de l'EMT, ces jonctions sont déstructurées, les protéines formant ces jonctions sont relocalisées ou dégradées. En particulier, la E-cadhérine, un constituant majeur des jonctions adhérentes, est clivée à la membrane plasmique puis dégradée (Yilmaz and Christofori, 2009). De même, la dissolution des jonctions serrées au cours de l'EMT s'accompagne d'une diminution de la claudine, de l'occludine et de ZO1 (Zona occludens 1) (Huang et al., 2012). On observe par ailleurs une perturbation des desmosomes et un désassemblage des jonctions GAP suite à une diminution des niveaux de connexines (Bax et al., 2011; Huang et al., 2012; Yilmaz and Christofori, 2009).

Une caractéristique majeure de tous les tissus épithéliaux est leur polarité apico-basale, le côté basal étant en contact avec la matrice extracellulaire, appelée lame basale dans ce contexte. Chez les vertébrés, cette polarité est assurée par différents complexes protéiques incluant les complexes "partitioning defective" PAR, les complexes Crumbs et les complexes Scribble (St Johnston and Ahringer, 2010). Au cours de l'EMT, et en association avec la dissolution des

jonctions intercellulaires, les complexes de polarité sont perdus. En effet, en plus d'une répression des gènes codant pour les protéines de polarité, la perte de la E-cadhérine favorise la perte de polarité en empêchant SCRIB d'interagir avec la membrane plasmique (Navarro et al., 2005).



**Figure 13 : Perte de l'intégrité épithéliale et acquisition de structures de migration et d'invasion.**

Le phénotype épithélial est caractérisé par la présence de jonctions cellulaires de plusieurs types incluant les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions GAP (a). Ces structures sont perdues au cours de l'EMT et remplacées par des structures de migration et d'invasion (b). Le cytosquelette d'actine forme des fibres de stress propices à la migration. Le profil d'expression des intégrines est modifié régulant ainsi différemment l'adhésion des cellules à la MEC. Des lamellipodes, filopodes et invadosomes se forment et permettent la migration et l'invasion à travers la sécrétion de MMP (Schéma de Lamouille et al., 2014).

### ***b) Structures de migration et d'invasion***

Le cytosquelette d'actine est une structure très dynamique, constamment remodelée et qui nécessite une régulation très fine. Il participe activement à la motilité et à l'invasion des cellules cancéreuses à travers la formation de projections (ou protrusions) membranaires. Ces projections incluent les lamellipodes, qui forment de larges étendues membranaires, les filopodes de forme pointue et les invadopodes, qui ont un rôle dans l'invasion grâce à des activités de dégradation de la MEC.

L'assemblage ramifié de l'actine, caractéristique des lamellipodes, est contrôlé par le complexe Arp2/3, lui-même contrôlé par des facteurs de nucléation de l'actine tels que les complexes N-WASP ou WAVE eux-mêmes recrutés à la membrane et activés par la petite protéine G, Rac1 (Yilmaz and Christofori, 2009). Les lamellipodes interagissent avec leur environnement via différentes molécules d'adhésion notamment des intégrines et des cadhérines (Comunale et al., 2007; Wang et al., 2008).

Les filopodes sont des extensions de forme allongée, composés de fines fibres d'actine non ramifiées, qui pénètrent dans l'environnement depuis la base des lamellipodes. Ils sont considérés comme des *senseurs* pour la cellule et sont utilisés pour détecter des signaux chimio-attracteurs ou des nutriments provenant par exemple des vaisseaux sanguins. L'assemblage de l'actine est ici contrôlé par la fascine, diphanous et VASP eux-mêmes contrôlés par Rac1 et Cdc42 (Yilmaz and Christofori, 2009).

Pour envahir les tissus, les cellules doivent remodeler la MEC via l'action de protéases et notamment des MMPs. Les invadosomes sont considérés comme le variant transformé des podosomes, structure présente dans les cellules migratoires non transformées comme les macrophages, les cellules dendritiques, les ostéoclastes, les cellules musculaires lisses ou encore les cellules endothéliales. Une différence majeure entre ces deux structures est la quantité de MEC dégradée et leur demi-vie. En effet, alors que les invadopodes peuvent subsister pendant plus d'une heure, les podosomes ont une activité de dégradation de la MEC plus faible et une demi-vie de quelques minutes. En revanche, leur architecture est similaire avec un noyau riche en filaments d'actine comprenant la machinerie d'assemblage de l'actine (WASP, cortactin et Arp2/3) et un complexe multimérique autour de ce noyau comprenant des intégrines, la vinculine, la taline et la paxiline (Yilmaz and Christofori, 2009). Les invadopodes permettent aux cellules cancéreuses de dégrader la MEC grâce à la libération de protéases, notamment la collagénase MMP14 et la gélatinase MMP2 (Kelly et al., 1998).

### *c) Implication de l'EMT dans la migration et l'invasion*

De nombreuses protéines importantes à la fois dans l'EMT et la formation des invadopodes ont été identifiées, suggérant que les invadopodes pourraient être le moyen pour les cellules EMT d'envahir les tissus. C'est le cas des facteurs de croissance EGF, HGF, PDGF et TGF $\beta$  qui induisent l'EMT et la formation des invadopodes (Yilmaz and Christofori, 2009). Dans ce contexte, la tyrosine kinase intracellulaire Src est activée par l'ensemble de ces facteurs de croissance et son rôle dans la formation des invadosomes a été largement décrit (Yilmaz and Christofori, 2009).

L'un des processus le plus important au cours de l'EMT est le "switch" des cadhérines, la E-cadhérine étant remplacée par la N-cadhérine. A travers ce "switch", la cellule perd ses capacités à adhérer aux cellules épithéliales voisines et au contraire acquiert une meilleure affinité pour les cellules mésenchymateuses grâce à des interactions homotypiques de la N-cadhérine. Ces interactions sont plus faibles que les interactions homotypiques impliquant la E-cadhérine et facilitent ainsi la migration cellulaire (Theveneau and Mayor, 2012). Comme la E-cadhérine, la N-cadhérine est connectée au cytosquelette à travers ses interactions avec l' $\alpha$ -caténine, la  $\beta$ -caténine et p120 caténine. De plus, elle interagit avec des récepteurs à activité tyrosine kinase comme le PDGF. Il a été montré que Twist induit l'expression de PDGFR $\alpha$  qui est nécessaire à la formation des invadosomes et des métastases dans le cancer du sein (Eckert and Yang, 2011).

L'EMT se caractérise aussi par un "switch" des filaments intermédiaires avec le remplacement de la Cytokératine par la Vimentine. Ces deux molécules régulent le trafic des organelles et des protéines membranaires, néanmoins, leur spécificité est différente. Par exemple, le trafic de la E-cadhérine à la membrane est permis par la Kératine mais pas par la Vimentine (Toivola et al., 2005). Des cellules épithéliales transfectées avec la Vimentine adoptent rapidement une forme mésenchymateuse avec une perte des desmosomes, une motilité cellulaire plus importante et une augmentation importante du turnover des points d'adhésion focaux (Mendez et al., 2010).

La modification des interactions cellule-MEC est essentielle pour l'initiation et la progression de l'EMT. Dans ce contexte, les intégrines jouent un rôle majeur dans la communication cellule-MEC et MEC-cellule. Au cours de l'EMT, les cellules montrent un profil d'expression des intégrines très différent. Par exemple, les cellules perdent l'intégrine  $\alpha 6 \beta 4$  et perdent ainsi leur interaction avec la membrane basale (Yang et al., 2009). D'un autre côté, l'intégrine  $\alpha 3 \beta 1$  qui se lie à la laminine, est essentielle pour la progression de l'EMT induite par le TGF $\beta$ , elle

facilite les interactions entre les voies de signalisation  $\beta$ -caténine et SMAD (Kim et al., 2009). L'expression de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  est aussi augmentée lors de l'EMT, et permet l'adhésion cellulaire à la fibronectine, autre marqueur de l'EMT, et la migration cellulaire (Maschler et al., 2005). L'expression des intégrines  $\beta 1$  est responsable de l'interaction avec le collagène de type I, et perturbe la localisation membranaire de la E-cadhérine par un mécanisme impliquant FAK (Focal adhesion kinase) (Koenig et al., 2006).

L'invasion des cellules tumorales nécessite non seulement une modification des interactions cellules-MEC, mais aussi un remodelage important de la MEC, impliquant nécessairement une étape de dégradation. Ce sont les MMPs dont l'expression est induite au cours de l'EMT qui sont majoritairement impliquées dans cette dégradation, notamment MMP2 et MMP9 (Nisticò et al., 2012). Néanmoins, le rôle des MMPs ne s'arrête pas à la dégradation des composants matriciels (Kessenbrock et al., 2010). Par exemple, certaines MMPs ont aussi une forte implication dans des activités de shedding (clivage d'ecto-domaine protéique), comme la MMP3, qui clive le domaine extracellulaire de la E-cadhérine, contribuant ainsi à la perte des jonctions adhérentes (Nisticò et al., 2012). En outre, l'implication de la MMP3 dans l'EMT est tout à fait pléiotrope puisqu'elle est capable d'induire l'EMT en favorisant l'épissage alternatif de Rac1b permettant ainsi la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'induction de l'expression de Snail1 (Radisky et al., 2005). Un phénomène extrêmement important lié à la dégradation de la MEC consiste en la libération de facteurs de croissance stockés au sein de la matrice. La MMP28 par exemple, induit l'EMT en facilitant le relargage du TGF $\beta$  stocké à l'état latent dans la MEC (Illman et al., 2006).

### **3.2) Résistance à la mort cellulaire et à la sénescence**

#### ***a) Résistance à l'apoptose : implication des facteurs de transcription pro-EMT***

L'acquisition d'un phénotype mésenchymateux peut aussi conférer à la cellule des capacités de résistance à l'apoptose. A titre d'exemple, l'induction de l'EMT par le TGF $\beta$  dans des hépatocytes fœtaux de rat, déclenche l'apoptose de la plupart des cellules, mais une sous-population exprimant les marqueurs mésenchymateux survit et résiste à l'apoptose induite par le TGF $\beta$  (Valdés et al., 2002). Il a été montré que cet effet est médié par un effet autocrine des ligands de l'EGFR (TGF $\alpha$  et HB-EGF) en réponse au TGF $\beta$  (del Castillo et al., 2006). De façon similaire, le traitement chronique de cellules cancéreuses mammaires NMuMG par le TGF $\beta$  génère des cellules qui échappent à l'apoptose et expriment les marqueurs de l'EMT (Gal et al., 2007). En accord avec ces observations, les facteurs de transcription pro-EMT tels

que Snail, Twist et Zeb, induits par le TGF $\beta$  au cours de l'EMT, sont connus pour avoir un effet anti-apoptotique (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Puisieux et al., 2005). Dans des hépatocytes adultes, qui ne subissent pas l'EMT en réponse au TGF $\beta$ , la surexpression de Snail1 protège les cellules de la mort induite par le TGF $\beta$  en activant la voie NF $\kappa$ B (Franco et al., 2010) démontrant bien le lien entre l'apparition du phénotype mésenchymateux et l'échappement à la mort induite par le TGF $\beta$ . Le rôle des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT a été plus largement démontré. Ainsi Snail1 protège les cellules MDCK (Madin-Darby Canine kidney epithelial cells) de la mort suite à une déprivation en facteurs de croissance ou à un traitement au TNF $\alpha$  en activant les voies de survie MEK/ERK et PI3K/AKT (Vega et al., 2004). Snail1 et Snail2 régulent la mort induite par des dommages à l'ADN en inhibant l'expression de gènes pro-apoptotiques comme Bid et Puma et des gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN. Par ailleurs, Snail1 et 2 inhibent directement l'expression de la protéine p53, acteur majeur de l'apoptose induite en réponse à des dommages à l'ADN (Kajita et al., 2004).

Enfin, l'expression de Twist-1 protège les cellules contre la mort induite par p53 en réprimant l'expression de p19<sup>ARF</sup> (p14<sup>ARF</sup>/CDKN2A chez l'homme), déstabilisant ainsi p53 (Maestro et al., 1999).

Le rôle des facteurs de transcription Zeb1 et Zeb2 dans la résistance à l'apoptose a aussi été suggéré. Ainsi Zeb2 favorise l'état G1/S des cellules en réprimant l'expression de la cycline D (Sayan et al., 2009) alors que le TGF $\beta$  induit l'apoptose dans des cellules synchronisées en G2/M et l'EMT dans des cellules synchronisées en G1/S (Yang et al., 2006b). De même, l'inhibition de Zeb1 dans des cellules mésenchymateuses pancréatiques reverse l'EMT et augmente leur sensibilité à des drogues agissant sur l'ADN (Arumugam et al., 2009) et l'ablation de Zeb1 rend les carcinomes squameux de la tête et du cou sensibles à un inhibiteur de l'EGFR, l'erlotinib (Haddad et al., 2009).

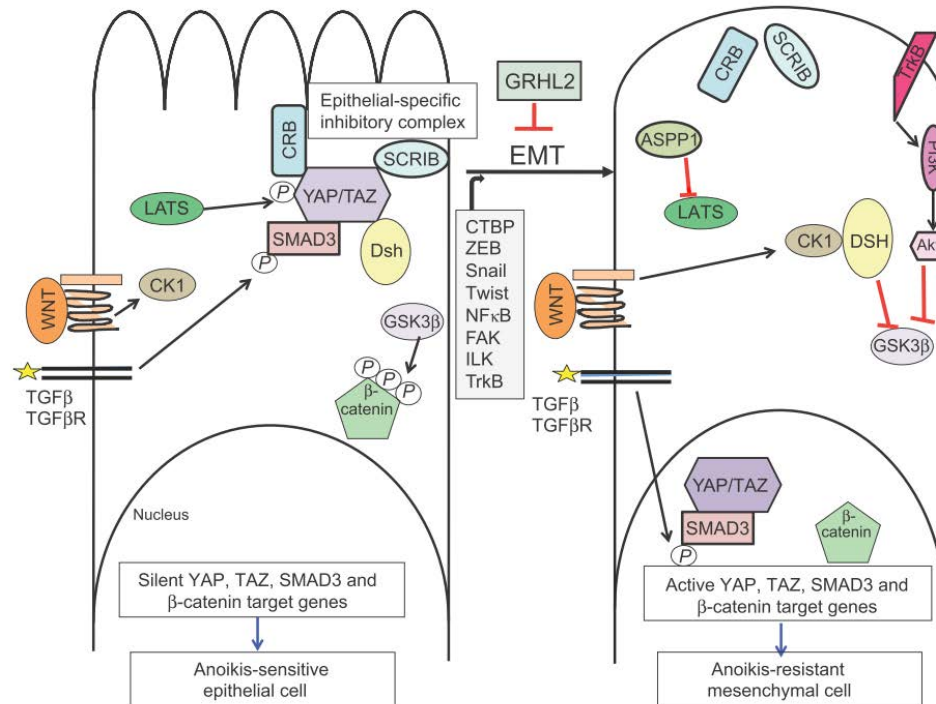
#### ***b) Résistance à l'anoïki***

Le phénomène d'anoïki (ou anoïkose en français) se caractérise par une mort induite par une absence de contacts cellulaires. Une résistance à l'anoïki est une caractéristique majeure des cellules invasives optant pour un mode de migration individuelle. L'anoïki n'est pas un mécanisme de mort à part entière, il utilise le système classique d'apoptose avec le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme et la formation de l'apoptosome, seul son mode d'initiation est différent.



La E-cadhérine joue un rôle primordial dans l'induction de la mort par anoïki. Ainsi, une répression de la E-cadhérine dans des lignées cellulaires mammaires aboutit à une protection des cellules contre l'anoïki (Derksen et al., 2006). Trois mécanismes d'action d'anoïki ont été décrits suite à la perte de la E-cadhérine au cours de l'EMT. La perte de la E-cadhérine libère la  $\beta$ -caténine qui est phosphorylée et active la voie Wnt induisant la résistance à l'anoïki (Onder et al., 2008). L'inhibition de la  $\beta$ -caténine restaure partiellement la sensibilité des cellules à l'anoïki. Par ailleurs, l'ankyrine-G, protéine reliant le cytosquelette avec des protéines transmembranaires, notamment la E-cadhérine, séquestre la protéine NRAGE dans le cytoplasme des cellules épithéliales. Mais au cours de l'EMT, la répression de la E-cadhérine et de l'ankyrine-G libère NRAGE qui peut agir comme répresseur transcriptionnel du gène p14<sup>ARF</sup>/CDKN2A, impliqué dans l'induction d'une mort par anoïki (Frisch et al., 2013). Enfin, la perte de la E-cadhérine peut aboutir à la phosphorylation de la protéine YAP (Yes-associated protein), protéine clé de la voie de signalisation Hippo, aussi impliquée dans la sensibilité à l'anoïki (Frisch et al., 2013).

Une autre caractéristique majeure des cellules mésenchymateuses est leur absence de polarité, caractérisée par une localisation membranaire anormale des complexes de polarité crumbs, Par et scribble. Ces derniers jouent un rôle majeur dans l'anoïki en modulant et en synchronisant trois voies de signalisation impliquées à la fois dans l'EMT et l'anoïki : Hippo, TGF $\beta$  et Wnt. Le modèle de régulation de l'anoïki par les complexes de polarité est présenté en **Figure 14**. Dans les cellules épithéliales, les complexes de polarité cellulaire crumbs et scribble stimulent la phosphorylation de YAP et TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) par la kinase LATS (Large tumor suppressor kinase), les maintenant ainsi dans le cytoplasme. YAP et TAZ interagissent avec SMAD3 phosphorylée empêchant sa translocation nucléaire même lorsque le récepteur au TGF $\beta$  est actif. De plus, TAZ interagit avec Dsh (disheveled) et inhibe de cette manière la voie canonique Wnt. Dans les cellules ayant subi l'EMT, les complexes de polarité ne sont plus localisés à la membrane, permettant ainsi la translocation nucléaire de YAP, TAZ et P-SMAD3 qui induisent l'expression des gènes de survie. De même, l'absence cytoplasmique de TAZ permet à Dsh d'être activée par un signal Wnt, et inhibe GSK3 $\beta$  empêchant ainsi la dégradation de la  $\beta$ -caténine qui peut aussi être transloquée dans le noyau et activer des gènes de résistance à l'anoïki (Frisch et al., 2013).



**Figure 14 : Les complexes de polarité régulent l'anoïki en contrôlant les voies de signalisation TGFβ, Hippo et Wnt.**  
(Schéma de Frisch et al., 2013).

Les composants de la matrice extracellulaire jouent aussi un rôle important dans la résistance à l'anoïki. Par exemple, la fibronectine, induite par le facteur pro-EMT, NFκB, est sécrétée et interagit avec les intégrines qui activent entre autre FAK et empêchent l'anoïki (Mehrotra et al., 2010). De la même manière, il a été montré que le collagène de type I est capable d'induire l'EMT via la stimulation de FAK et de ILK (integrin-like kinase) qui vont stimuler les voies de survie PI3K et MAPK (Shintani et al., 2008).

Les facteurs de transcription majeurs de l'EMT, Snail, Twist et Zeb, jouent un rôle indirect sur l'anoïki en contrôlant l'expression des gènes cités précédemment tels que la E-cadhérine, les complexes de polarité ou encore la fibronectine. Leur rôle direct concerne une inhibition générale de l'apoptose comme décrit précédemment, plutôt qu'un mécanisme spécifique à l'anoïki.

### c) EMT et sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire a été proposée comme un mécanisme qui protège l'organisme contre l'initiation et la progression cancéreuse. On distingue deux types de sénescence, la sénescence répllicative qui implique la perte progressive des télomères aux extrémités des chromosomes, et la sénescence induite par un oncogène (OIS), décrite dans les cellules cancéreuses et qui



met en jeu les régulateurs du cycle cellulaire p53 et p16<sup>Ink4a</sup> (Serrano et al., 1997). L'OIS semble être principalement induite dans les tumeurs bénignes, suggérant un rôle contre la transformation maligne et la nécessité pour les tumeurs malignes d'outrepasser l'OIS (Chandeck and Mooi, 2010).

Les facteurs de transcription impliqués dans l'EMT peuvent empêcher la sénescence. Par exemple, Zeb1 diminue l'expression de p63 et p73, deux homologues de p53 impliqués dans la sénescence cellulaire (Fontemaggi et al., 2001) via la répression des gènes de la cyclin-dépendant kinase 1 (CDK1) et de la cycline B (CCNB) (Jung et al., 2001). Réciproquement, p63 peut réprimer l'expression de Zeb1 en se fixant directement sur son promoteur (Testoni et al., 2006). De même, p53 peut inhiber Zeb1 via l'expression de miR200c indiquant que les médiateurs de l'EMT peuvent empêcher la sénescence et que les modulateurs de la sénescence peuvent affecter négativement l'EMT. Le fonctionnement de l'axe p53-miR200c-Zeb1 a été montré dans des cellules endothéliales où le traitement avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit l'expression du miR200c de façon dépendante de p53 et réprime Zeb1 en lien avec un phénotype sénescence. La surexpression dans ces mêmes cellules d'une forme de Zeb1 insensible au miR200c inhibe la sénescence induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et p53 (Magenta et al., 2011). Zeb2, quant à lui, peut protéger les cellules de la sénescence induite par l'EGFR en réprimant directement l'expression de la cycline D1 (Ohashi et al., 2010).

Le facteur Twist-1 peut aussi interférer avec les mécanismes de sénescence. Ainsi, Twist-1 inhibe la sénescence induite par c-Myc dans des fibroblastes de rat et l'extinction de Twist-1 et 2 dans des cellules murines de cancer mammaire ou dans des cellules de mélanome aboutit à l'arrêt de la croissance en phase G1 et une augmentation de la sénescence (Ansieau et al., 2008).

Enfin, le facteur Snail a été identifié comme un modulateur de la sénescence. Contrairement à H-Ras et N-Ras, K-Ras n'induit pas immédiatement la sénescence, et son expression dans des fibroblastes de souris induit la stabilisation de Snail-1, qui, en se fixant à p53, inhibe sa fonction (Lee et al., 2009). Par ailleurs, la surexpression de Snail-1 bloque aussi le cycle cellulaire en réprimant la cycline D2.

#### ***d) EMT et "oncogene addiction"***

Le concept d'addiction à un oncogène repose sur l'observation de la dépendance des cellules cancéreuses à un seul oncogène pour la prolifération et la survie en dépit d'une multitude de protéines mutées (Sharma and Settleman, 2007). Dans ce contexte, l'acquisition d'un phénotype EMT pourrait permettre aux cellules de ne plus être dépendantes d'un oncogène

unique. Des cellules de carcinome de poumon qui sont dépendantes de K-Ras pour leur prolifération perdent cette dépendance après une EMT induite par le TGF $\beta$  (Singh and Settleman, 2009). Snail2 a par ailleurs été montré pour être indispensable à la survie de cellules cancéreuses mutées pour K-Ras alors qu'il ne l'était pas dans des cellules K-Ras WT (Wang et al., 2010).

### **3.3) EMT et immunosuppression**

L'EMT peut aussi conférer aux cellules une capacité à réduire les défenses immunitaires participant ainsi à la progression tumorale. Par exemple, la co-culture de cellules de mélanomes B16-F10 surexprimant Snail avec des cellules de la rate augmente l'expression de FoxP3 dans les lymphocytes T régulateurs CD4+, connus pour favoriser la progression tumorale. Cet effet est médié en partie par une sécrétion de TGF $\beta$  (Kudo-Saito et al., 2009). *In vivo*, des cellules de mélanomes surexprimant Snail sont résistantes à l'immunothérapie. Il est à noter que les agents immunosuppresseurs utilisés lors de greffe d'organe pour éviter les rejets, induisent une dédifférenciation des cellules épithéliales (Felton et al., 2011). Snail-1 peut aussi induire le recrutement de macrophages en favorisant la sécrétion de l'IL6 et l'IL8 et affecter la migration des macrophages induite par le TGF $\beta$  dans la maladie de Crohn et chez des patients atteints de rectocolite hémorragique (Hotz et al., 2009).

### **3.4) EMT et chimiorésistance**

L'un des obstacles majeurs dans les thérapies anti-tumorales est le risque de rechute lié au fait que certaines cellules sont résistantes aux thérapies utilisées et notamment aux chimiothérapies.

De nombreuses études ont montré que l'induction d'une EMT par différentes cytokines ou facteurs de transcription confère aux cellules une résistance aux chimiothérapies. A l'inverse, après traitement de cellules cancéreuses avec des chimiothérapies, les cellules montrent un phénotype mésenchymateux. Par exemple, les cellules de la lignée épithéliale de carcinome de colon, KM12L4, traitées à l'oxaliplatine expriment les marqueurs de l'EMT (Yang et al., 2006a). Par conséquent, la question se pose de savoir si la chimiothérapie induit un phénotype mésenchymateux ou si la chimiothérapie permet l'enrichissement de cellules résistantes, c'est à dire les cellules ayant subi l'EMT.

Bien qu'il soit clairement établi que les cellules mésenchymateuses sont résistantes aux chimiothérapies, les mécanismes moléculaires restent mal connus. En effet, la plupart des travaux réalisés montrent des mécanismes relatifs à une résistance à l'apoptose en général (et

qui confèrent une chimiorésistance par la même occasion) mais qui ne sont pas spécifiques à la drogue en elle-même. Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer les résistances spécifiques aux chimiothérapies : 1) altérations de la composition lipidique de la membrane plasmique entraînant une diminution de la pénétration de la drogue dans la cellule ; 2) augmentation de la capacité de réparation de l'ADN, entraînant une diminution ou une inhibition du phénomène d'apoptose; 3) modifications de la cible de la drogue; 4) métabolisation et inactivation de la drogue; 5) perte des récepteurs ou transporteurs de surface empêchant la drogue d'entrer dans la cellule; 6) augmentation de l'efflux de la drogue (Allen and Weiss, 2010).

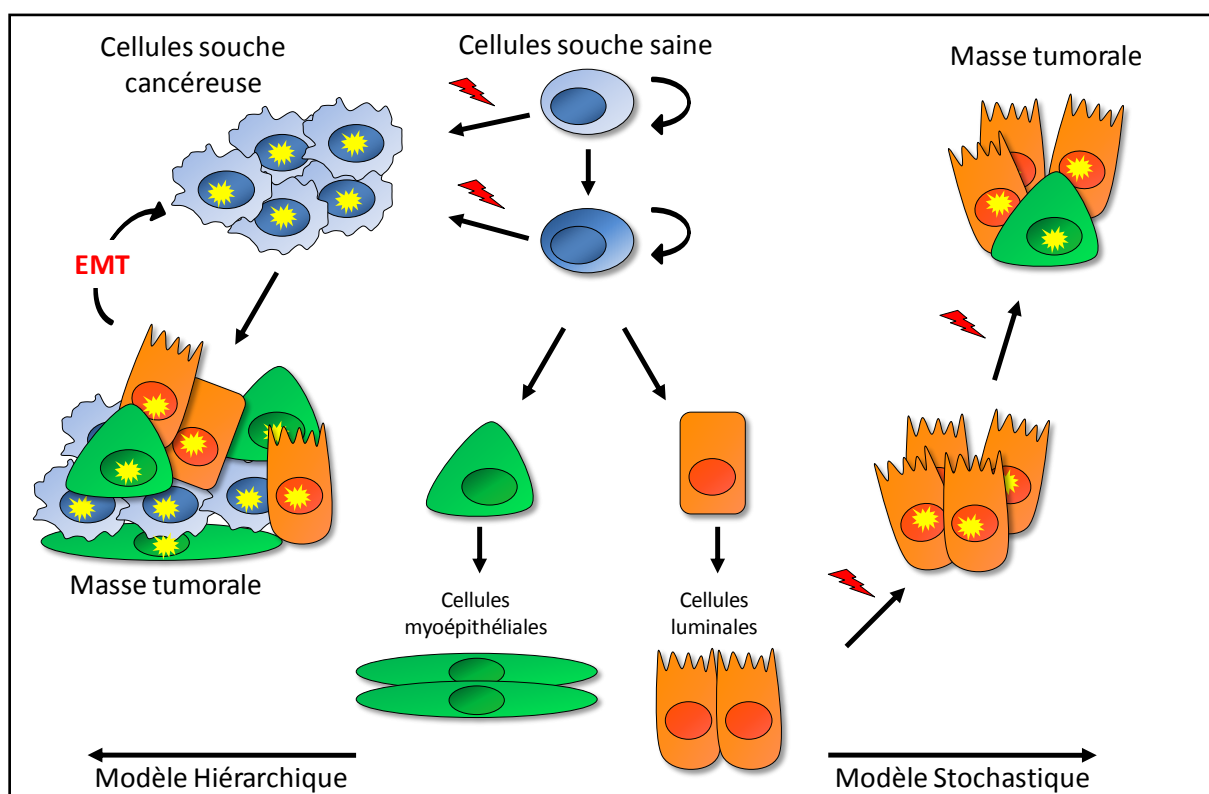
Il a été montré que MDR1 (MultiDrug Resistance 1), une protéine de la famille des récepteurs ABC, responsable de l'efflux de substances étrangères à l'extérieur de la cellule, est fortement induite dans des cellules subissant l'EMT en réponse à l'adriamycine. Cet effet est dépendant du facteur de transcription Twist-1 (Li et al., 2009b). De plus, l'induction de l'EMT par l'EGF dans une lignée cancéreuse mammaire induit l'expression du récepteur ABCC3, qui joue un rôle majeur dans la résistance aux chimiothérapies (Stewart et al., 2015). De façon surprenante, une analyse protéomique sur des cellules traitées au TGF $\beta$  montre une augmentation des caractères mésenchymateux et une diminution des protéines liées à la réparation de l'ADN, suggérant que ce mécanisme n'intervient pas dans la chimiorésistance des cellules EMT (D'Souza et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés sur une lignée tumorale mammaire MCF7 surexprimant MDR1, sélectionnée par degré croissant de résistance à la doxorubicine. En effet, dans ces cellules ayant subi l'EMT (les plus résistantes à la doxorubicine), les gènes de réparation de l'ADN BRCA1/2 et p53 sont fortement réprimés (Tsou et al., 2015). Néanmoins, ces protéines étant aussi impliquées dans l'apoptose (Kumar et al., 2012), on peut s'attendre à ce qu'elles soient effectivement réprimées au cours de l'EMT.

### **3.5) EMT et cellules souches**

En dépit de leur origine clonale, les tumeurs sont de nature hétérogène comprenant des cellules avec des caractéristiques morphologiques et moléculaires variées (Pardal et al., 2003). Cette hétérogénéité, longtemps expliquée par l'apparition de mutations, a été revisitée avec la notion de cellules souches cancéreuses (Pattabiraman and Weinberg, 2014). Cette sous-population, aussi appelée "cellules initiant le cancer" a la capacité de s'autorenouveler et de régénérer l'hétérogénéité des tumeurs avec un très faible nombre de cellules. Elle a été identifiée dans plusieurs cancers incluant la leucémie myéloïde aigüe, le cancer du sein, le

cancer du cerveau, le cancer du colon et le cancer du pancréas (Al-Hajj et al., 2003; Hermann et al., 2007; Lapidot et al., 1994; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Singh et al., 2004). En plus de pouvoir régénérer une tumeur, ces cellules initiant le cancer sont très résistantes aux thérapies hormonales et aux chimiothérapies (Chang et al., 2005) et sont enrichies suite au traitement. Aussi, il est nécessaire de trouver de nouvelles cibles pour éliminer ces cellules cancéreuses souches potentiellement responsables des rechutes.

Deux modèles ont été suggérés quant à l'origine des cellules souches cancéreuses : le modèle hiérarchique dans lequel les CSC proviendraient de cellules souches devenues cancéreuses, et le modèle stochastique dans lequel les CSC proviendraient de cellules cancéreuses différenciées ayant subi une dédifférenciation vers un état proche des cellules souches (Figure 15). Ces deux possibilités existent probablement. Il est à noter que sur la base des travaux de Bonnet et Dick, montrant que les CSC dans la leucémie possèdent les marqueurs CD34+/CD38- et des propriétés similaires à celles des cellules souches normales, il a été suggéré que les CSC pourraient provenir de cellules souches normales ayant subi une transformation (Bonnet and Dick, 1997).



Adapté de Shinitzin and Polak 2008

**Figure 15 : Modèles permettant d'expliquer l'hétérogénéité d'une tumeur.**

Dans le modèle stochastique, l'hétérogénéité des tumeurs est expliquée par la différenciation de cellules cancéreuses en d'autres types cellulaires. Dans le modèle hiérarchique, les cellules souches devenues cancéreuses donneraient naissance à l'ensemble des types cellulaires tumoraux. L'EMT pourrait induire la dédifférenciation des cellules tumorales en CSC (Schéma adapté de Shipitsin and Polyak, 2008).

De même, il a été montré dans le cancer du sein, que la signature d'expression de gènes des cellules de type basal-like présentant une mutation du gène BRCA1 était similaire aux progéniteurs de type luminal normaux. Cette étude va dans le sens où les CSC proviendraient de cellule souches normales devenues cancéreuses.

Ces conclusions ont néanmoins été mises à mal par des travaux montrant que des cellules différenciées peuvent acquérir la multipotence des cellules souches embryonnaires par l'introduction de quatre facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, c-Myc, et Klf4) (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). L'implantation de ces cellules, nommées iPS (induced pluripotent stem), dans des souris immunodéprimées conduit à la formation d'une tumeur complète. De plus, le facteur de transcription SOX2, qui induit la reprogrammation en cellules souches pluripotentes, est amplifié dans plusieurs cancers humains. A l'inverse, le facteur de transcription p16/INK4a, qui bloque la reprogrammation en cellules souches pluripotentes, est délété dans ces mêmes cancers (Banito et al., 2009; Bass et al., 2009; Li et al., 2009a; McCaughan et al., 2010; Utikal et al., 2009; Yuan et al., 2010).

Des preuves empiriques ont permis de connecter l'EMT à l'émergence de cellules souches cancéreuses. Des cellules épithéliales mammaires ayant subi l'EMT par un traitement TGFβ ou par la surexpression de facteurs de transcription pro-EMT comme Snail présentent une population CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> proche de celle des CSC mammaires. De même, les cellules souches mammaires normales ou cancéreuses présentent les marqueurs classiques de l'EMT. De plus, les études menées par l'équipe de Weinberg ont montré que le profil d'expression de gènes de cellules cancéreuses agressives est similaire à celui de cellules souches embryonnaires (Ben-Porath et al., 2008).

Bien que de nombreuses études *in vitro* aient démontré que les cellules ayant subi une EMT exprimaient aussi des marqueurs de cellules souches mammaires (à savoir CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>), il est à noter que l'EMT et l'état souche d'une cellule peuvent parfois être désynchronisés. C'est par exemple le cas pour le facteur de transcription Prrx1 dont l'inhibition par shRNA induit une épithélialisation accompagnée d'une acquisition des caractères souches (Ocaña et al., 2012).

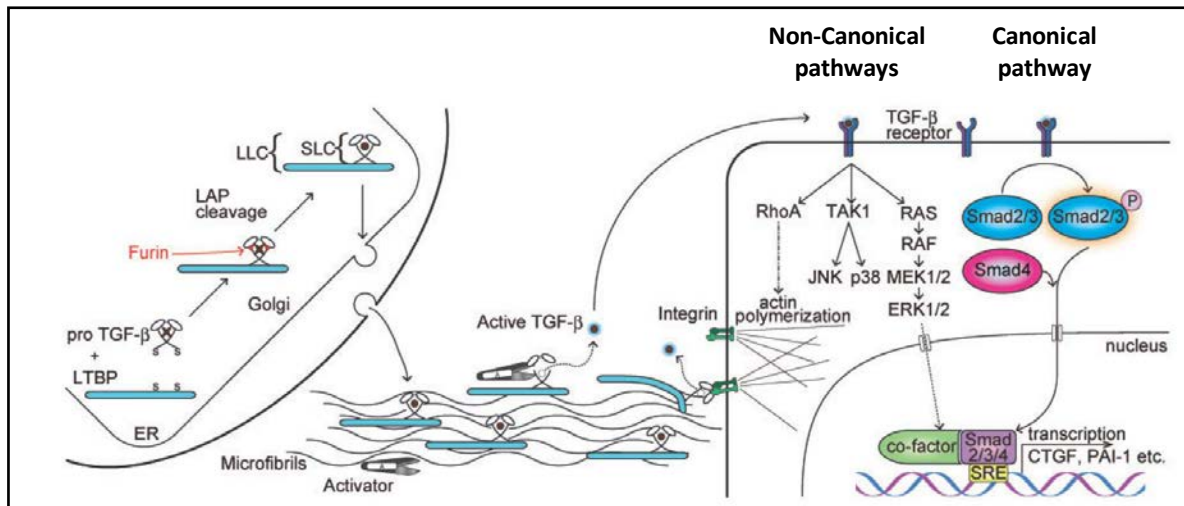
## IV) Mécanismes d'activation de l'EMT induite par le TGFβ

Le TGFβ (Transforming growth factor β) est une cytokine multifonctionnelle qui régule le développement et l'homéostasie cellulaire (Ikushima and Miyazono, 2011). La dérégulation de l'activité du TGFβ est associée à de très nombreuses pathologies comme la fibrose et le cancer (Tian et al., 2011). Les 50 000 articles publiés à ce jour sur le TGFβ (Pubmed, 2015) soulignent la pléiotropie fonctionnelle de cette cytokine, capable de promouvoir et inhiber une même fonction biologique selon le contexte cellulaire. Ainsi, le TGFβ inhibe la prolifération des cellules épithéliales mais induit celle des cellules mésenchymateuses, il favorise la différenciation mais augmente la pluripotence des cellules souches, il inhibe la croissance des cellules tumorales mais favorise leur invasion. Dans ce contexte, Il est clairement admis que le type cellulaire mais aussi le contexte cellulaire dans lequel agit le TGFβ va déterminer la réponse de la cellule (Massagué, 2012). Comprendre comment le TGFβ régule toutes ces fonctions constitue aujourd'hui un enjeu majeur pour le développement de thérapies spécifiques.

### 4.1) Ligands et récepteurs

La superfamille du TGFβ est une large famille de cytokines structuralement proches qui doit son nom au premier membre découvert en 1983 : le TGFβ1 (Assoian et al., 1983). Elle contient deux sous-familles : la sous-famille TGFβ/Activine/Nodal et la sous-famille BMP (bone morphogenic protein)/GDF (growth and differentiation factor)/MIS (Muellerian inhibiting substance) qui ont des séquences similaires et des voies de signalisation spécifiques. Il existe en réalité 3 types de TGFβ nommés TGFβ1, TGFβ2 et TGFβ3 qui sont codés par trois gènes distincts et aboutissent à trois protéines partageant 76 à 80% d'homologie. Ces TGFβ sont synthétisées par de nombreux types cellulaires dont les plaquettes, les macrophages, les fibroblastes ou encore les cellules tumorales, sous forme d'un précurseur homodimérique inactif constitué d'un propeptide, le LAP (latency associated peptide), lié de façon covalente avec la forme active du TGFβ (**Figure 16**). Le Pro-TGFβ est clivé par des enzymes de type furine à l'intérieur des cellules pour produire un TGFβ mature qui reste associé de façon non covalente au LAP pour former le petit complexe latent (SLC, small latent complex). Secrété sous cette forme SLC, le TGFβ ne peut pas se fixer sur son récepteur et la libération d'un TGFβ actif requiert sa dissociation du LAP. Celui-ci se lie dans le milieu extracellulaire avec une protéine de type LTBP (latent TGFβ-binding protein), cet agrégat trimoléculaire constitue le grand complexe latent (LLC, large latent complex). Ces

deux complexes conduisent à la séquestration du TGF $\beta$  dans la matrice. De nombreux mécanismes dépendants ou non des protéases ont été impliqués et la Thrombospondine-1 (TSP1) est l'activateur majeur du TGF $\beta$  *in vivo*. D'autres acteurs ont été impliqués comme la plasmine, la thrombine, l'élastase, les MMP2-9, les intégrines  $\alpha\beta 6$  et  $\alpha\beta 8$ , mais aussi la chaleur, les espèces réactives de l'oxygène et plus récemment les forces mécaniques.

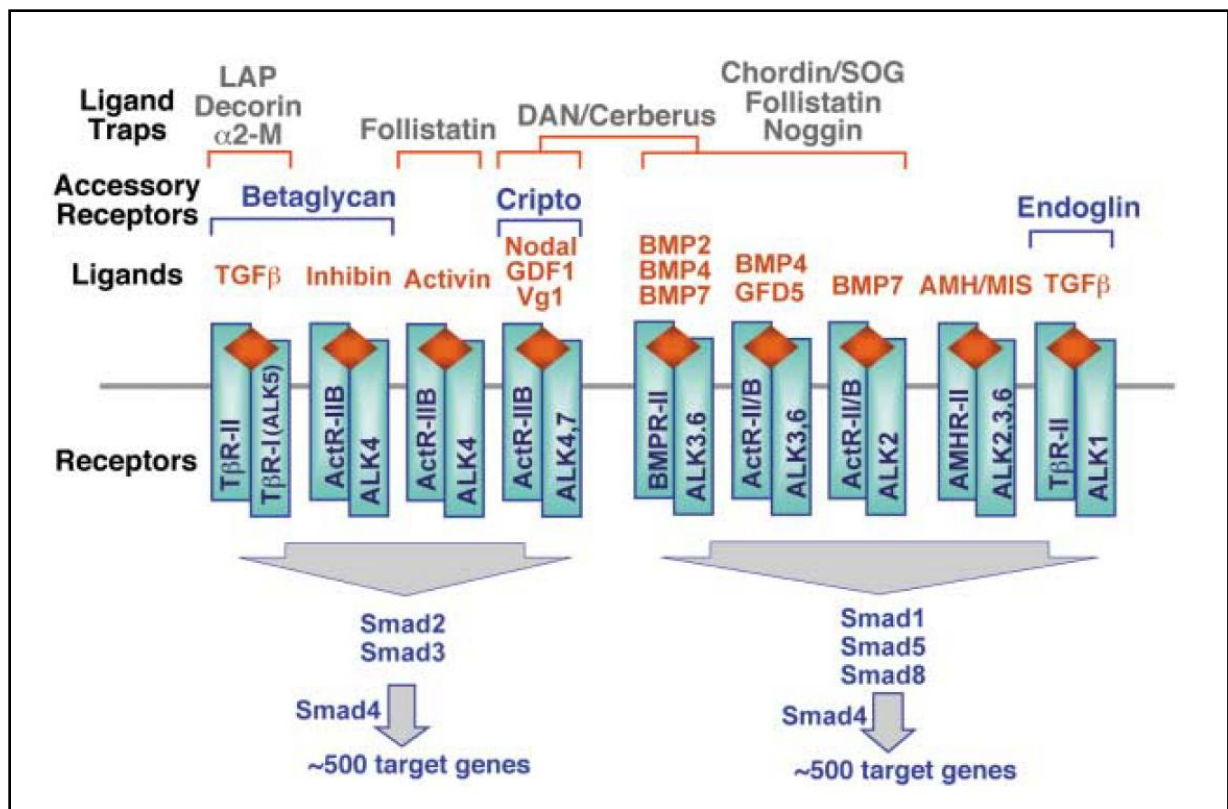


**Figure 16 : Latence du TGF $\beta$ , activation et signalisation.**

Le TGF $\beta$  est synthétisée sous une forme inactive. Le pro-TGF $\beta$  lié au LTBP et au peptide LAP est sécrété dans la matrice extracellulaire où il est stocké. Sa libération nécessite le clivage de LAP. Alors, le TGF $\beta$  libre se fixe sur ses récepteurs et induit les voies de signalisation SMAD et non-SMAD (Schéma adapté de Horiguchi et al., 2012b).

Suite à son activation, le TGF $\beta$  induit une réponse cellulaire en se fixant à des récepteurs spécifiques, les récepteurs au TGF $\beta$  de type I et II (T $\beta$ RI et T $\beta$ RII respectivement), ayant une activité de type sérine/thréonine kinase (Massagué, 2012). Le TGF $\beta$  se fixe au T $\beta$ RII, qui est constitutivement actif, formant ainsi un complexe hétérodimérique qui peut alors recruter T $\beta$ RI et l'activer par phosphorylation. La transduction du signal à partir des récepteurs jusqu'au noyau est assurée par la phosphorylation des protéines SMADs (voie canonique) ou par l'activation de voies dites non SMAD (non canoniques). Tous les membres de la famille TGF $\beta$  fonctionnent avec des récepteurs différents qui recrutent des protéines SMAD différentes (**Figure 17**). Des régulateurs extracellulaires peuvent moduler le signal TGF $\beta$ . Ainsi, le betâglycane, un protéoglycane transmembranaire aussi connu comme récepteur au TGF $\beta$  de type III, a été montré pour médier la liaison du TGF $\beta$  au récepteur de type II avec une meilleure affinité sans initier la transduction d'un signal, ce système agissant plutôt comme un concentrateur de ligand à proximité du T $\beta$ RII. D'autres protéines solubles telles que la décorine ou l' $\alpha 2$ -macroglobuline, agissent comme des pièges, séquestrant le TGF $\beta$  et empêchant ainsi sa fixation au récepteur.





**Figure 17 : Complexité des ligands et récepteurs de la famille TGFβ/BMP.**

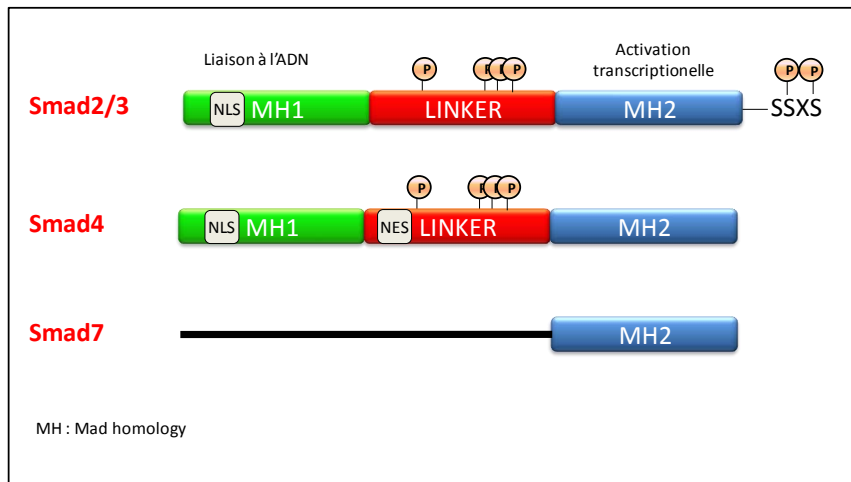
La régulation extracellulaire de la signalisation des récepteurs de la famille TGFβ/BMP est complexe. Un premier degré de complexité implique la combinatoire de dimérisation des récepteurs. Un même ligand peut se fixer sur des récepteurs différents comme le TGFβ qui peut se fixer sur le couple TβRII/TβRI et TβRII/ALK1 et induire respectivement la voie SMAD2/3 et SMAD1/5/8. La fixation des ligands sur leurs récepteurs peut-être facilitée par des récepteurs accessoires tels que le Betaglycan et l'Endogline pour le TGFβ. Enfin, d'autres protéines peuvent agir sur la biodisponibilité des ligands en les séquestrant. C'est le cas du peptide LAP, qui est lié au TGFβ dès la synthèse de la protéine, ou encore de la Décorine et de l'α2-Macroglobuline (Schéma de Shi and Massagué, 2003).

## 4.2) Voies de signalisation

### a) Activation de la voie canonique SMAD

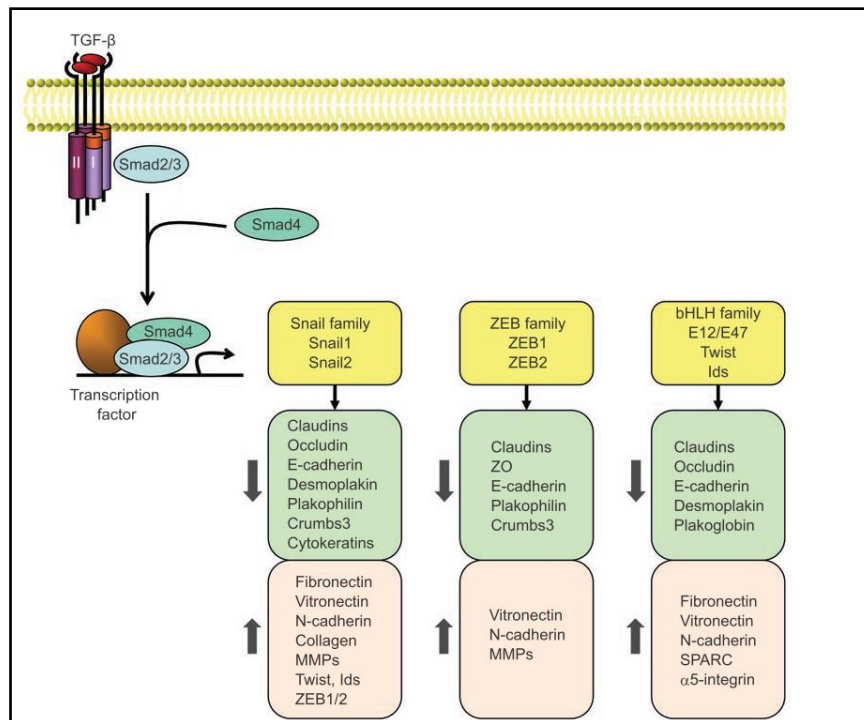
Les protéines SMAD tiennent leur nom des protéines homologues MAD (mother against decapentaplegic) de la drosophile et des protéines SMA (small body size) de Caenorhabditis elegans (Derynck et al., 1996). Les protéines SMAD sont classées en 3 catégories : les R-SMAD (receptor regulated smads), les Co-SMAD (common mediator smads) et les I-SMAD (inhibitory smads)(Figure 18). La structure des R-SMAD et des Co-SMAD est similaire, avec un domaine MH1 (mad homology 1) responsable de la fixation à l'ADN, une région linker flexible, un domaine MH2 responsable de l'activité transcriptionnelle et une séquence consensus SSXS à leur extrémité C-terminale. Les I-SMAD, inhibiteurs des R-SMAD, n'ont en revanche que le domaine MH2.





**Figure 18 : Structure des protéines SMAD.**

A l'état de repos, SMAD2/3 (R-SMAD) sont ancrées à la membrane sous forme dimérique grâce à des protéines comme SARA, les domaines MH1 et MH2 étant associés l'un à l'autre. Suite à la fixation du TGF $\beta$  sur les récepteurs de type II et, ce dernier phosphoryle le T $\beta$ RI sur sa séquence GS localisé entre le domaine transmembranaire et le domaine kinase. Le T $\beta$ RI, alors actif, phosphoryle et active SMAD2 et SMAD3 via son activité sérine/thréonine kinase à la fois dans le domaine linker et au niveau de son extrémité C-terminale. A noter que les récepteurs de la famille des BMP sont quant à eux capables d'activer les R-SMAD 1, 5 et 8. Les R-SMADs forment ensuite des hétérotrimères avec SMAD4 (Co-SMAD) qui transloquent dans le noyau et régulent ainsi l'activité transcriptionnelle de nombreux gènes. Les SMAD inhibitrices SMAD6 et SMAD7 (I-SMAD) empêchent l'activation des R-SMAD par le récepteur. SMAD6 inhibe préférentiellement les voies des BMP en interagissant avec les R-SMAD activées et empêchent la formation du complexe avec SMAD4. SMAD7 inhibe à la fois la signalisation TGF $\beta$  et BMP. Il peut former un complexe stable avec le récepteur de type I bloquant ainsi la phosphorylation des R-SMAD, ou recruter des E3 ubiquitines ligases, telles que Smurf1/2, aboutissant à l'ubiquitination et la dégradation des récepteurs de type I. De plus, SMAD7 inhibe aussi la signalisation TGF $\beta$  au niveau du noyau en interagissant avec des répresseurs transcriptionnels tels que des histones déacétylases ou en empêchant la fixation des R-SMAD à l'ADN. Puisque la transcription de SMAD7 est notamment activée par le TGF $\beta$ , SMAD7 constitue un rétrocontrôle négatif dont l'activité régule la durée et l'amplitude du signal TGF $\beta$ .



**Figure 19 : Implication de la voie SMAD dans la régulation des gènes de l'EMT.**

*Les protéines SMAD activées sont des facteurs de transcription qui régulent directement l'expression de gènes de l'EMT, réprimant les gènes épithéliaux, et activant les gènes mésenchymateux. Ils régulent aussi indirectement les gènes de l'EMT en activant l'expression des facteurs de transcription "maîtres" de l'EMT comme Snail, ZEB et bHLH (Schéma de Xu et al., 2009).*

L'implication des protéines SMAD dans l'EMT a été largement documentée (**Figure 19**). L'augmentation de l'expression de SMAD2/3 et SMAD4 induit l'EMT ou la facilite lorsque le T $\beta$ RI est transfecté sous forme active dans les cellules de souris NmuMG (Piek et al., 1999; Valcourt et al., 2005) alors que l'expression d'un dominant négatif de SMAD2 et SMAD3 bloque l'EMT dans ce système (Valcourt et al., 2005). La contribution de SMAD2 à l'EMT a néanmoins été remise en cause par une étude réalisée sur des souris délétées du gène SMAD2 ou SMAD3 uniquement dans les hépatocytes. Les hépatocytes SMAD2<sup>-/-</sup> avaient un aspect morphologique mésenchymateux et des capacités de migration accrues alors que les hépatocytes SMAD3<sup>-/-</sup> étaient incapables de faire l'EMT suite à un traitement au TGF $\beta$  (Ju et al., 2005). Cependant, une autre étude a montré que la surexpression de la forme active de SMAD2 facilite l'invasion des cellules tumorales fusiformes (issues de kératinocytes) et potentialise fortement l'EMT lorsque H-Ras est co-surexprimé (Oft et al., 2002).

De la même manière, SMAD4 est indispensable à l'EMT. L'inhibition par siRNA de SMAD4 ou l'expression d'un dominant négatif de SMAD4 empêche l'EMT induite par le TGF $\beta$  dans des hépatocytes de souris (Kaimori et al., 2007) et des lignées tumorales pancréatiques

humaines (Takano et al., 2007). A l'inverse, la surexpression de SMAD7 bloque l'EMT induite par le TGF $\beta$  (Saika et al., 2004; Xu et al., 2007).

### ***b) Voies de signalisation non-SMAD***

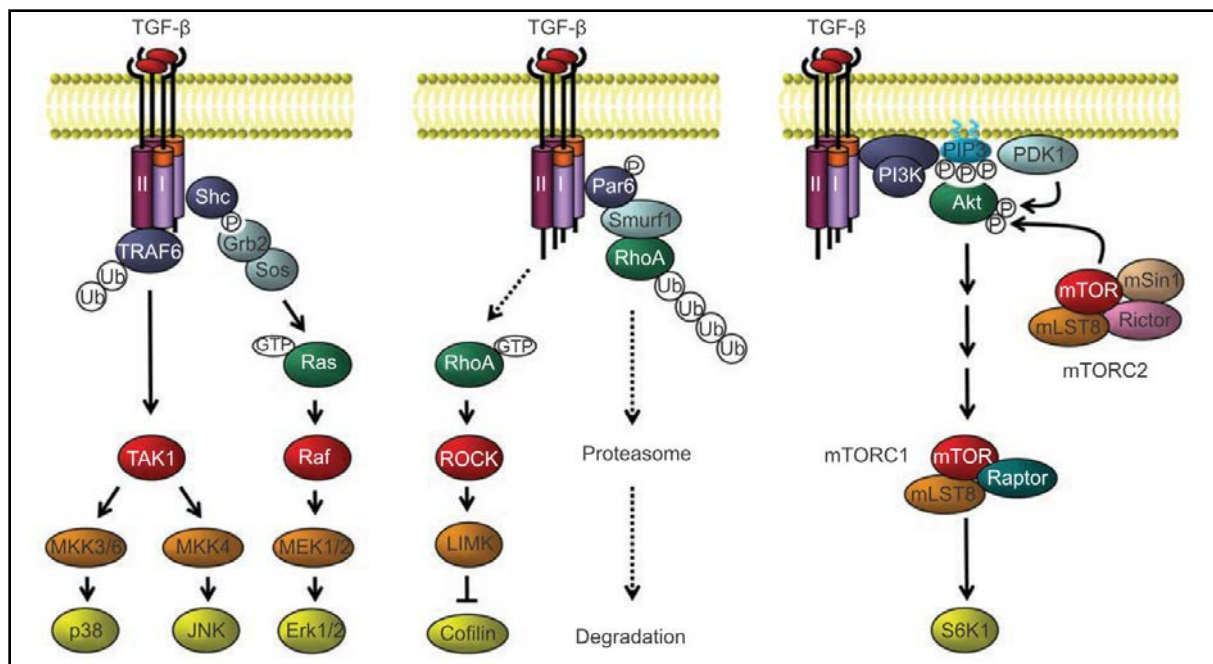
Le TGF $\beta$  peut aussi induire l'activation de voies de signalisation dites non canoniques ou non-SMADs, qui sont des voies généralement activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase (**Figure 20**). Ce sont les voies MAPK (Mitogen activated protein kinase), RhoA et PI3K. Selon les modèles cellulaires, les voies non-SMAD peuvent suivre ou non une cinétique comparable à celle des SMAD.

### **Les voies MAP kinases**

#### **Voie Ras - ERK**

En réponse au TGF $\beta$ , la protéine adaptatrice ShcA s'associe au récepteur du TGF $\beta$  de type I et est phosphorylée par celui-ci sur une sérine et une tyrosine, permettant ainsi le recrutement de Grb2 et Sos. Le complexe ainsi formé, initie l'activation de Ras, une petite protéine G qui induit la cascade de signalisation Raf-MEK1/2-ERK1/2 (Lee et al., 2007). Par ailleurs, une autre étude a montré que ShcA et Grb2 sont recrutées au niveau du récepteur de type II lorsque le récepteur est phosphorylé par Src (Galliher and Schiemann, 2007). Il faut noter cependant que l'activation de ERK par le TGF $\beta$  est plus faible que l'activation par des récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR.

Cette voie est impliquée dans l'EMT induite par le TGF $\beta$ . En effet, l'utilisation d'un inhibiteur chimique contre MEK1/2 empêche l'induction d'un phénotype mésenchymateux après traitement au TGF $\beta$  dans des cellules épithéliales murines (Xie et al., 2004). De même, l'activation de la voie ERK par l'EGF permet l'induction d'une EMT par le TGF $\beta$  après 24H de traitement, temps auquel les cellules ne répondent pas en présence de TGF $\beta$  uniquement (Grände et al., 2002; Uttamsingh et al., 2007). La coopération du TGF $\beta$  et de la voie ERK pourrait être en partie due à une augmentation de Snail2 menant à une répression de la E-cadhérine (Schmidt et al., 2005) et à une augmentation de la sécrétion de TGF $\beta$  (Lehmann et al., 2000). Le TGF $\beta$  est aussi capable d'induire la voie ERK5 dans des hépatocytes murins de façon dépendante de Src. Cette activation permet une augmentation de l'expression protéique de Snail1, et est réversée lorsque les cellules sont transfectées avec un dominant négatif de MEK5, activateur direct de ERK5 (Marchetti et al., 2008).



**Figure 20 : Voies de signalisation non canoniques du TGFβ.**

*En plus des voies SMADs, le TGFβ peut activer d'autres voies classiquement activées par des récepteurs à activité tyrosine kinase. Parmi elles, on compte les voies MAPK (p38, JNK, ERK), la voie PI3K et la voie RhoA. Chacune d'elles joue un rôle important dans l'EMT induite par le TGFβ (Schéma de Xu et al., 2009).*

### Voies p38MAPK et JNK

Le TGFβ est aussi capable d'activer les voies p38MAPK et JNK via un mécanisme commun. En effet, la protéine TRAF6 (E3 ubiquitine ligase) interagit avec le TβRI et s'auto-ubiquitine en réponse à un signal TGFβ. Cette ubiquitination est nécessaire pour l'activation de TAK1 (TGFβ activated kinase) qui phosphoryle à la fois MKK3/6 et MKK4, activateurs de p38MAPK et JNK respectivement (Sorrentino et al., 2008). Ces voies de signalisation sont nécessaires à l'EMT induite par le TGFβ puisque l'inhibition de p38MAPK, JNK, ou TRAF6 empêche l'EMT induite par un traitement au TGFβ (Alcorn et al., 2008; Yamashita et al., 2008; Yu et al., 2002).

### Voie RhoA

Les protéines Rho-like GTPases, comprenant les sous-familles Rho, Rac et Cdc42, sont des régulateurs clés de l'organisation du cytosquelette, de la migration cellulaire, de la polarité cellulaire et de l'expression génique. L'activation de RhoA en réponse au TGFβ active ROCK (Rho-associated protein kinase) qui agit sur la formation des fibres de stress d'actine. De plus, le TGFβ active la kinase LIM, en aval de ROCK, qui inactive la cofiline, impliquée dans la dépolymérisation de l'actine (Vardouli et al., 2005).

L'utilisation d'un dominant négatif de RhoA inhibe l'EMT induite par le TGF $\beta$ . De façon surprenante, l'utilisation de dominants négatifs de SMAD3, Rac1 ou JNK n'a pas d'effet dans ce modèle (Bhowmick et al., 2001a). Néanmoins, la régulation de RhoA est complexe, et implique un contrôle spatio-temporel de l'activité de RhoA. En particulier, au niveau des jonctions serrées, Par6 interagit avec le récepteur de type I au TGF $\beta$ . En réponse au TGF $\beta$ , le récepteur de type II s'associe au récepteur de type I et induit la phosphorylation de Par6 qui recrute Smurf1 ce qui a pour conséquence une ubiquitination et une dégradation de RhoA au niveau des jonctions serrées, facilitant ainsi leur désassemblage (Ozdamar et al., 2005). L'utilisation d'une protéine Par6 ne pouvant pas recruter Smurf1 inhibe l'EMT induite par le TGF $\beta$ . Donc, le TGF $\beta$  induit à la fois l'activation de RhoA d'une façon générale dans la cellule, mais aussi sa dégradation localement au niveau des jonctions serrées, les deux types de régulation étant nécessaires à l'EMT induite par le TGF $\beta$ .

### **Voie PI3K**

La PI3K (Phosphatidylinositol-triphosphate kinase) est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la survie, la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire. Il existe trois classes de PI3K. Les enzymes de classe I sont des hétérodimères régulés par les récepteurs tyrosine kinase et les récepteurs couplés aux protéines G effectuant la conversion de phosphatidylinositol 2-phosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP3). Ces hétérodimères sont notamment composés de sous-unités régulatrices p85 contenant un domaine SH3 et d'une sous-unité effectrice p110, plusieurs variants existant parmi ces sous-unités.

A l'instar des facteurs de croissance agissant via des récepteurs à activité tyrosine kinase, le TGF $\beta$  est capable d'induire la voie PI3K, menant à l'activation de la kinase AKT. L'activation de la PI3K mène à la phosphorylation du PIP2 en PIP3. Le PIP3 résultant sert d'ancrage membranaire à des protéines possédant un domaine plextrin homology (PH) comme AKT et PDK1. Il en résulte une phosphorylation de AKT par PDK1 et par le complexe mTORC2 (aussi appelé PDK2) sur deux sites différents et à l'activation complète de AKT. En aval, le complexe mTORC1 est activé par AKT, et active lui-même d'autres effecteurs dont S6K1, une kinase impliquée dans la traduction et la prolifération cellulaire.

L'activation de la PI3K par le TGF $\beta$  implique une interaction directe de la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3K avec les récepteurs de type I et II (Yi et al., 2005). Comme pour les voies de signalisation précédemment décrites, l'inhibition de la voie PI3K par des inhibiteurs de la PI3K, ou par un dominant négatif de AKT, résulte en l'inhibition de l'EMT

induite par le TGF $\beta$  (Bakin et al., 2000a; Kattla et al., 2008). De façon intéressante, la voie PI3K/AKT/mTOR/S6K est induite au cours de l'EMT suite à un traitement au TGF $\beta$ . Néanmoins, l'inhibition de mTOR par la rapamycine inhibe la migration et l'invasion associée au phénotype EMT mais ne bloque pas les changements de marqueurs de l'EMT (Lamouille and Derynck, 2007). Par ailleurs, l'activation de S6K  $\alpha$ , en plus d'un rôle dans la traduction, la capacité d'induire transcriptionnellement Snail1 et de promouvoir l'EMT (Pon et al., 2008). En même temps, la glycogen synthase 3-beta (GSK3 $\beta$ ), dont l'activation est inhibée par la voie AKT, joue un rôle anti-EMT en favorisant la dégradation de Snail (Zhou et al., 2004).

#### **4.3) Coopération avec d'autres récepteurs**

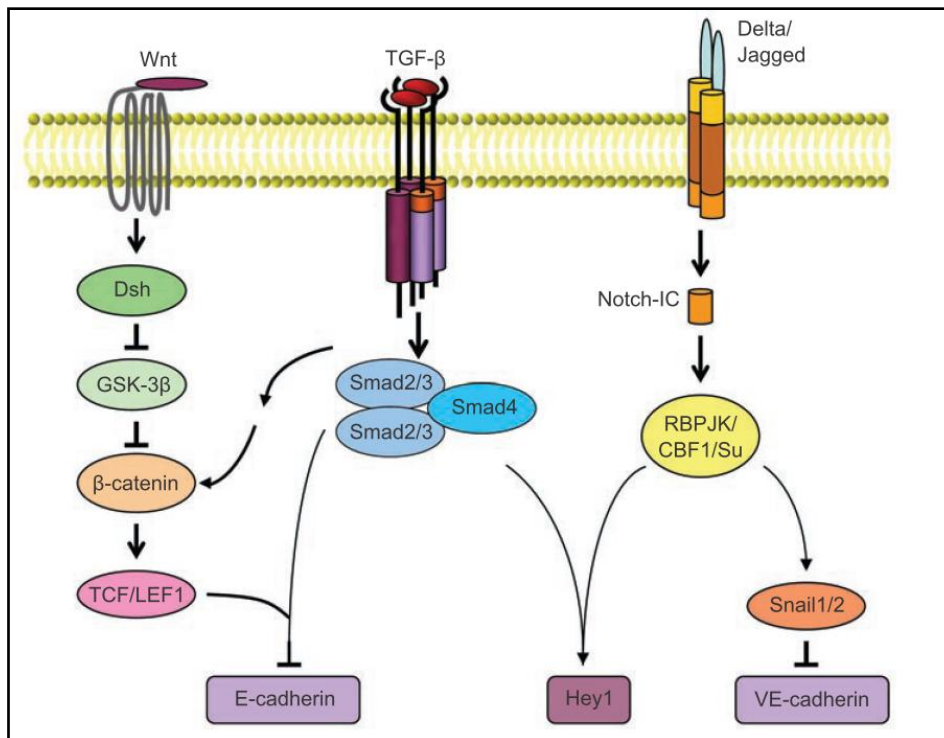
Comme illustré ci-dessus, le TGF $\beta$  peut induire des voies de signalisation non-SMAD qui sont aussi activées par d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase. L'EMT peut être induite par une grande variété de signaux, notamment les voies Wnt et Notch qui n'activent pas les mêmes voies que le TGF $\beta$  mais qui coopèrent avec les voies du TGF $\beta$  (**Figure 21**).

##### ***a) Voie Wnt***

La voie de signalisation canonique induite par les glycoprotéines Wnt via leur liaison à un récepteur complexe composé d'une protéine à sept domaines transmembranaires (Frizzled) implique la  $\beta$ -caténine, qui est aussi un composant des jonctions serrées reliant la E-cadhérine au cytosquelette. En réponse à Wnt, la protéine Disheveled est activée et inhibe GSK-3 $\beta$  qui lui-même induit la phosphorylation et la dégradation de la  $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine s'accumule ainsi dans le cytoplasme et forme un complexe avec les facteurs de transcription TCF et LEF1. Les complexes sont ensuite transloqués dans le noyau et induisent les gènes cibles.

Dans le contexte de l'EMT, il a été montré que SMAD2 et SMAD4 forment un complexe avec LEF1 au niveau du promoteur de la E-cadhérine permettant ainsi son inhibition. De même, la formation d'un complexe entre SMAD4 et LEF1 est requise pour l'acquisition de caractères mésenchymateux et de propriétés migratoires (Nawshad et al., 2007). Au cours de la morphogenèse du cœur, qui implique le processus d'EMT induite par le TGF $\beta$ , la  $\beta$ -caténine est indispensable puisque son absence dans des embryons de souris provoque une formation anormale des septums (Liebner et al., 2004).





**Figure 21 : Interactions fonctionnelles entre les voies SMAD et les voies de Wnt et Notch dans l'EMT.**

*Il existe une coopération entre les voies de signalisation SMAD et les voies de signalisation Wnt et Notch nécessaire à l'EMT induite par le TGFβ (Schéma de Lamouille and Derynck, 2007).*

### ***b) Voie Notch***

La voie Notch peut être activée par différents ligands : Delta ou Delta-like et Jagged ou Serrate. Quand un ligand se lie au récepteur Notch, Notch subit deux clivages consécutifs. Le premier est réalisé par ADAM17 (aussi appelée TACE pour TNFα converting enzyme) au niveau extracellulaire et libère le fragment extracytoplasmique de Notch. Le second clivage est réalisé par un complexe γ-secretase au niveau intracellulaire. Ainsi, le domaine intracellulaire de Notch est libéré dans le cytoplasme puis est transloqué dans le noyau où il se lie aux facteurs de transcription RBPJK/CBF1/Su(H) et convertit ce complexe répresseur en un complexe activateur de gènes cibles incluant les gènes Hey et Hes. La signalisation Notch est impliquée dans l'EMT lors de la progression tumorale et du développement cardiaque.

Il a été montré que le facteur de transcription Hey1, une cible bien connue de la voie Notch, est requis pour l'EMT induite par le TGFβ et pour la migration. Plus précisément, le TGFβ induit l'expression de Hey1 et de Jagged1 de façon dépendante de SMAD3. Après un délai de quelques heures, l'expression de Hey1 est à nouveau augmentée, cette fois de façon indépendante de SMAD3 mais dépendante de Notch (Zavadil et al., 2004).

#### **4.4) La Matrice Extracellulaire, un déterminant majeur de la réponse au TGF $\beta$**

Comme nous l'avons vu précédemment, la réponse cellulaire au TGF $\beta$  dépend du contexte et du type cellulaire dans lequel il agit. La MEC est un déterminant majeur de la réponse cellulaire au TGF $\beta$ . Dans ce contexte, les intégrines jouent un rôle important pour médier la communication entre la cellule et la MEC. En particulier, les intégrines contrôlent l'activité du TGF $\beta$  et vice versa. Par exemple, les intégrines  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha\beta8$  et  $\alpha8\beta1$  peuvent se lier au peptide LAP et stimuler la libération du TGF $\beta$  actif (Shi et al., 2011). Ainsi, des souris dont le peptide LAP est muté sur la séquence de fixation aux intégrines (via le motif RGD) ont un phénotype similaire à celui des souris KO TGF $\beta$  (Dickson et al., 1995; Yang et al., 2007). Les intégrines peuvent aussi jouer un rôle directement sur les voies de signalisation du TGF $\beta$ . En particulier, l'intégrine  $\beta1$  et ILK, voie de signalisation classique associée aux intégrines, sont nécessaires à l'EMT induite par le TGF $\beta$  (Serrano et al., 2013; Truong et al., 2014). De même, la liaison d'intégrines spécifiques au récepteur au TGF $\beta$  de type II induit la phosphorylation de FAK et Src, deux autres kinases impliquées dans le processus d'EMT (Galliher and Schiemann, 2006; Scaffidi et al., 2004). Les intégrines ne sont pas les seuls déterminant de la réponse TGF $\beta$ . Les métalloprotéases matricielles ainsi que les ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) jouent un rôle majeur dans l'activation et la voie de signalisation du TGF $\beta$ . Par exemple les MMP2 et MMP9 participent la libération du TGF $\beta$  latent (Yu and Stamenkovic, 2000), et leur expression est induite par le TGF $\beta$  au cours de l'EMT (Kim et al., 2007). Enfin, notre laboratoire a démontré que la métalloprotéase ADAM-TS1 permet aussi la libération du TGF $\beta$  latent par un mécanisme n'impliquant pas son activité protéolytique (Bourd-Boittin et al., 2011), et qu'ADAM12 module la signalisation du TGF $\beta$  que ce soit vis à vis des voies SMAD (Atfi et al., 2007) ou non SMAD (Leyme et al., 2012).

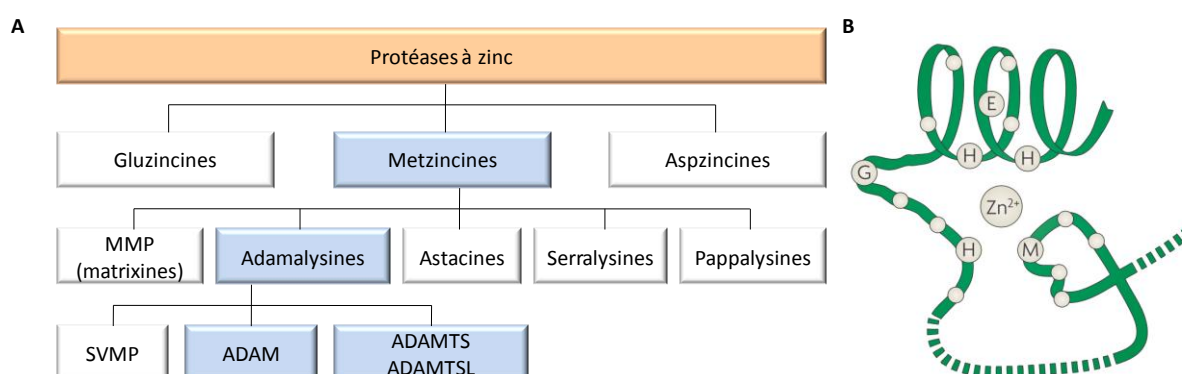


## CHAPITRE II :

### ADAM12, UNE ADAMALYSINE IMPLIQUEE DANS LE CANCER

#### I) La famille ADAM

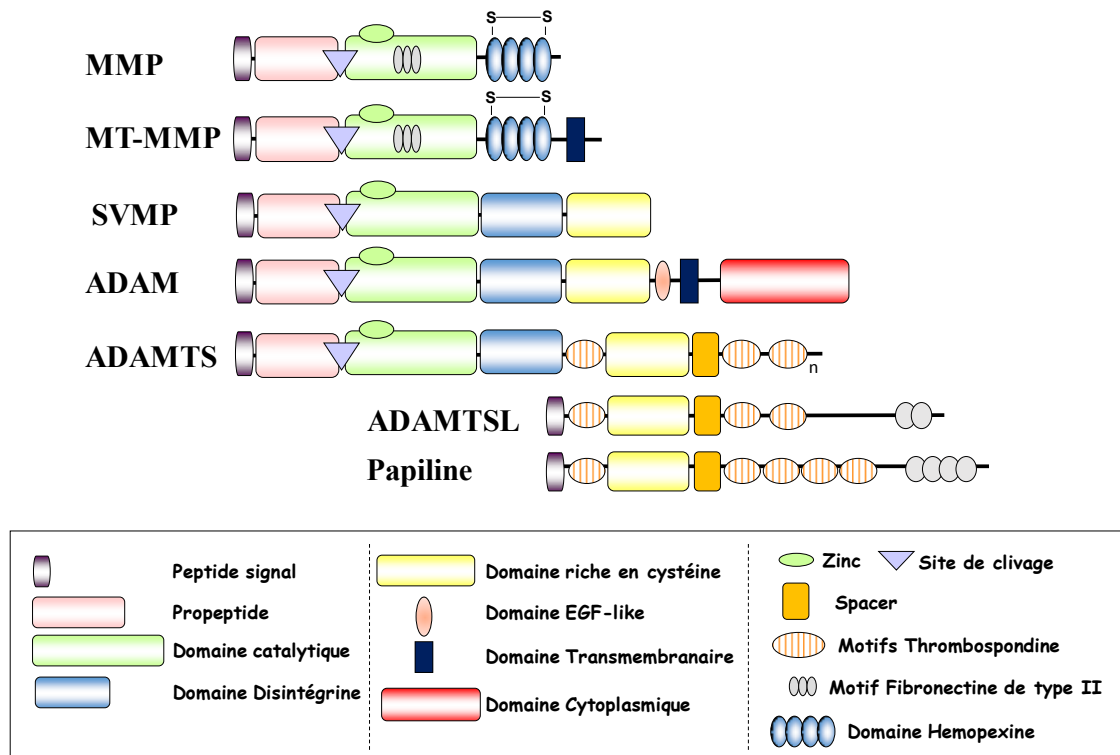
ADAM12 appartient à la famille des ADAM pour A Disintegrin And Metalloprotease, qui constitue avec les métalloprotéases de venin de serpent (SVMPs) et les ADAM contenant des motifs thrombospondine (ADAMTS) la famille des adamalysines (**Figure 22**). Avec la famille des Matrix Metalloproteinases, les adamalysines représentent plus de 80 % des protéines de la famille des metzincins qui forme le principal groupe de la famille des métalloprotéases dépendantes du Zinc.



**Figure 22 : Classification des métalloprotéases dépendantes du zinc, et structure du domaine catalytique des métalloprotéases.**

*Les protéines ADAMs appartiennent à la famille des Adamalysines qui constituent, avec les MMPs, la majorité des protéines de la famille des métalloprotéases dépendantes du zinc (A). Les métalloprotéases possèdent un domaine catalytique commun caractérisé par un motif HEXHXXGXXH avec trois résidus histidine liant l'atome de zinc et une structure "met-turn" au niveau du site actif (B).*

A ce jour, 24 ADAMs, 20 ADAMTS et 6 ADAMTSL ont été identifiées chez l'homme avec une structure commune composée de domaines retrouvés dans les métalloprotéases matricielles (MMP et MT-MMP pour membrane-type métalloprotéase) et les métalloprotéases de venin de serpent, SVMP (**Figure 22 et Figure 23**). Les ADAMTSL (ADAMTS-like) constituent une nouvelle famille ne présentant ni domaine MMP, ni domaine Disintegrin mais partageant un domaine conservé riche en cystéines avec les ADAMTS et présent dans la protéine matricielle Papiline (**Figure 23**).



**Figure 23 : Organisation multidomaine des métalloprotéases matricielles et des adamalysines.**

Le rôle des ADAMs a été essentiellement lié à leur activité protéolytique qui participe à l'activation de nombreux effecteurs de la signalisation, comme le récepteur à l'EGF via le clivage de ses ligands, HB-EGF, TGF $\alpha$  ou encore l'amphiréguline. Cependant, seulement la moitié des ADAMs présentent une activité catalytique *in vitro* et seules cinq d'entre elles ont des substrats identifiés (Edwards et al., 2008; Murphy, 2008). Contrairement aux ADAMs qui sont essentiellement des protéines transmembranaires, les ADAMTS (ADAMs avec des motifs thrombospondine) et ADAMTSL (ADAMTS-like, sans domaine protéolytique) sont des protéines sécrétées. Ces protéines sont caractérisées par un domaine ancestral commun contenant un ou plusieurs motifs thrombospondine, TSR (ThromboSpondine Repeats), qui facilite leur ancrage dans la matrice extracellulaire (Brunet et al., 2015; Dubail and Apte, 2015).

Les Adamalysines ont été associées à un très grand nombre de processus physiologiques et pathologiques comme la fertilité, le développement du cœur et du tissu adipeux, l'ostéoarthrite, la maladie d'Alzheimer ou encore le cancer pour n'en citer que quelques uns (Dubail and Apte, 2015; Edwards et al., 2008). De nombreuses altérations de l'expression des Adamalysines ont été associées à la progression tumorale et leurs effets sont très pléiotropes,

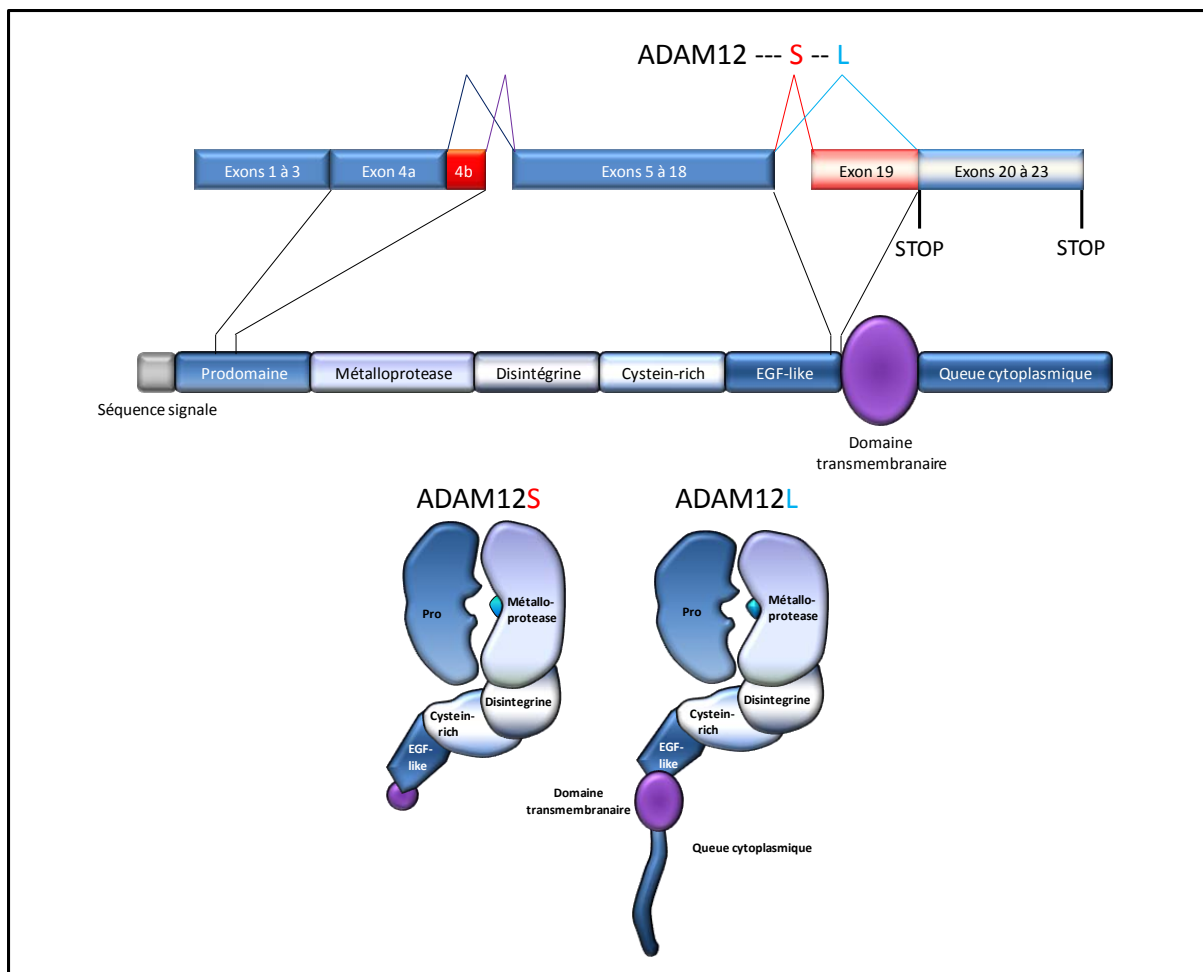
modifiant la communication et la signalisation cellulaire et contribuant aux modifications du microenvironnement (Cal and López-Otín, 2015; Duffy et al., 2009).

C'est dans le contexte de maladies chroniques hépatiques que notre équipe a identifié la protéine ADAM12 comme un nouvel acteur de la progression tumorale du carcinome hépatocellulaire.

ADAM12 a été identifiée en 1995 par les travaux du Pr. Fujisawa Sehara. C'est en recherchant des protéines homologues aux fertilines  $\alpha$  et  $\beta$ , impliquées dans la fusion des spermatozoïdes avec l'œuf, qu'ont été découvertes les meltrines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  respectivement renommées ADAM12, ADAM19 et ADAM9 (Yagami-Hiromasa et al., 1995). Comme les fertilines, les meltrines peuvent jouer un rôle dans les processus de fusion notamment dans le contexte de formation des myotubes chez la souris. A la suite de cette identification, de nombreuses études ont permis de caractériser les fonctions physiopathologiques dans lesquelles ADAM12 est impliquée.

## II) Expression génique d'ADAM12

Le gène ADAM12 humain est localisé sur le chromosome 10q26 et conduit à l'expression de deux principaux variants d'épissage alternatif : une forme longue membranaire ADAM12L, et une forme courte sécrétée ADAM12S qui n'est pas présente chez la souris (Kurisaki et al., 2003; Yagami-Hiromasa et al., 1995). De plus, un autre site d'épissage a été récemment mis en évidence au niveau de l'exon 4 dans des cellules épithéliales mammaires et des cellules cancéreuses mammaires (Duhachek-Muggy et al., 2013) (**Figure 24**).



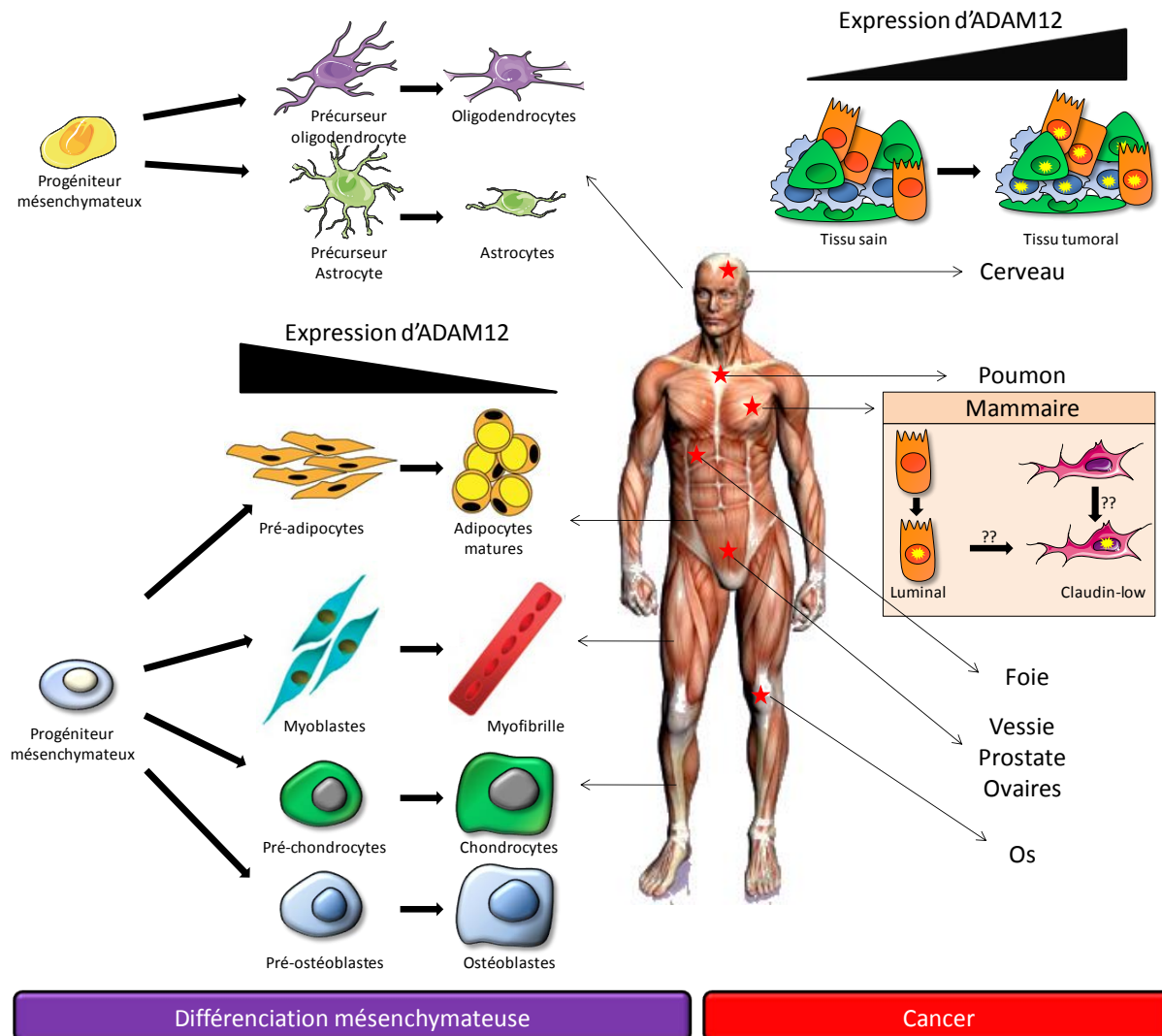
**Figure 24 : ADAM12 : Epissage, structure et domaines fonctionnels.**

*L'épissage alternatif d'ADAM12 après l'exon 18 résulte en la synthèse d'une forme sécrétée ADAM12S (short) et d'une forme membranaire ADAM12L (long), qui possède en plus un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique.*

## 2.1) Expression tissulaire

La distribution tissulaire d'ADAM12 est essentiellement limitée à des tissus mésenchymateux (**Figure 25**). Au cours du développement chez la souris, ADAM12 est exprimée dans les condensations mésenchymateuses à l'origine des muscles squelettiques et des os (Kurisaki et al., 1998). L'ARNm d'ADAM12 est absent du muscle adulte chez la souris mais réapparaît lors de la régénération musculaire (Galliano et al., 2000). L'expression d'ADAM12 a aussi été retrouvée dans les myoblastes au cours de leur fusion (Galliano et al., 2000) tandis qu'elle disparaît dans les myotubes différenciés (Cao et al., 2003). Plus généralement, l'expression d'ADAM12 a été associée inversement à la différenciation des cellules mésenchymateuses dont les adipocytes (Kawaguchi et al., 2003), les ostéoblastes (Inoue et al., 1998; Verrier et al., 2004), les ostéoclastes (Abe et al., 1999; Verrier et al., 2004), les chondroblastes (Kveiborg et al., 2006), les cellules étoilées hépatiques (Le Pabic et al., 2003), les

trophoblastes du placenta (Gilpin et al., 1998). ADAM12 est aussi présent dans les oligodendrocytes qui constituent le type différencié de ces cellules (Bernstein et al., 2004).



**Figure 25 : Expression tissulaire d'ADAM12 chez l'humain.**

L'expression d'ADAM12 est associée à la différenciation des tissus mésenchymateux des muscles, des os et du tissu adipeux (panel de gauche). Son expression est forte dans les cellules non différenciées et faible dans les cellules après différenciation. ADAM12 est aussi exprimée au niveau du cerveau dans les cellules différenciées tels que les oligodendrocytes et les astrocytes mais son expression au cours de la différenciation de ces cellules n'est pas connue. Par ailleurs, l'expression d'ADAM12 est retrouvée dans de nombreux tissus cancéreux (panel de droite) au niveau des cellules cancéreuses ou des cellules stromales. Dans le cancer mammaire, l'expression d'ADAM12L est présente dans le sous-type claudin-low, connu pour avoir la signature mésenchymateuse la plus forte.

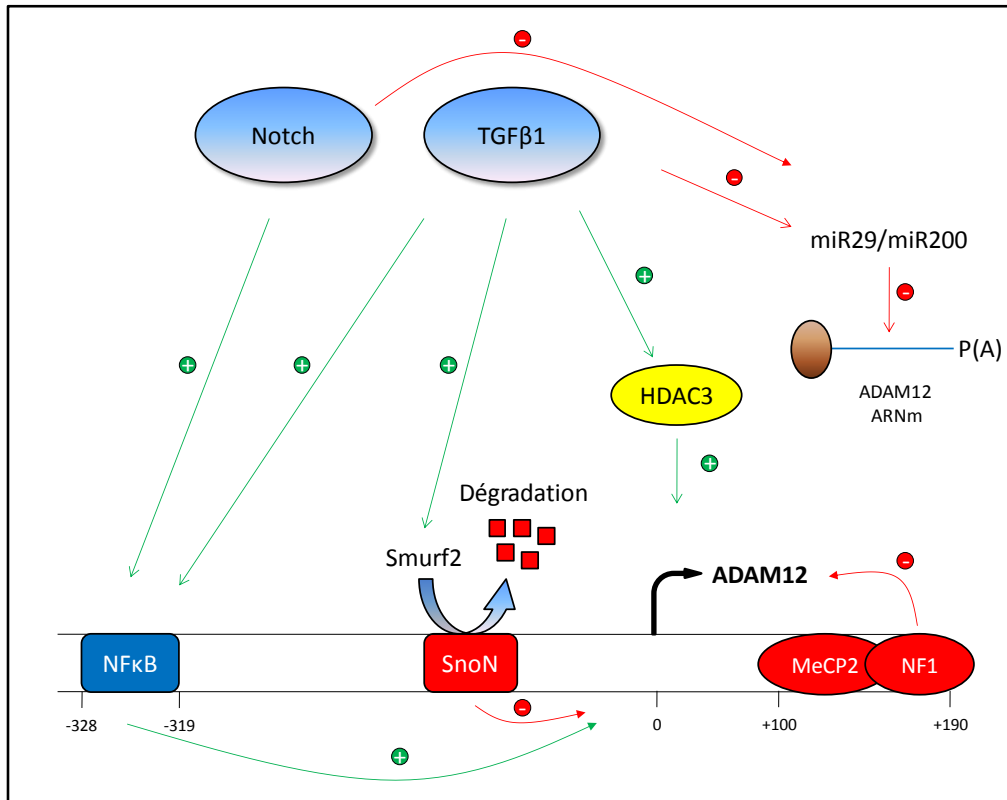
## 2.2) Régulation transcriptionnelle

Notre équipe a montré pour la première fois que l'expression d'ADAM12 était induite par le TGF $\beta$  dans les cellules étoilées hépatiques via la p70S6 kinase (Le Pabic et al., 2003, 2005). Plus récemment, l'équipe de Solomon a confirmé cette induction de l'expression d'ADAM12 par le TGF $\beta$  dans la lignée de fibroblaste d'embryon de souris NIH3T3 et dans la lignée de

cellules épithéliales de glandes mammaires de souris NMuMG (Solomon et al., 2010). Les auteurs ont démontré que l'induction de l'expression d'ADAM12 résulte en réalité d'une dérégulation du gène via l'inactivation du co-répresseur SnoN. En effet, SnoN est un régulateur négatif de la signalisation TGF $\beta$ , il se lie aux SMADs nucléaires et réprime leur activité transcriptionnelle (Deheuninck and Luo, 2009)(Figure 26). En réponse au TGF $\beta$ , SnoN est ubiquitiné et dégradé, levant ainsi la répression des gènes cibles des SMADs. Ainsi, la surexpression de SnoN empêche l'induction d'ADAM12 par le TGF $\beta$  et au contraire, son inhibition favorise l'expression d'ADAM12 (Solomon et al., 2010). Un autre mécanisme de régulation par le TGF $\beta$  faisant intervenir la voie NF $\kappa$ B a été mis en évidence dans les cellules de la lignée de carcinome mammaire MDA-MB-231 (Ray et al., 2010). Les auteurs ont identifié un élément de réponse dans le promoteur (-329/-318) sur lequel se fixe directement NF $\kappa$ B. L'altération de ce site ou la perturbation de la voie NF $\kappa$ B diminue l'induction de l'expression d'ADAM12 induite par le TGF $\beta$ . Une troisième étude publiée la même année a mis en évidence le rôle de l'histone HDAC3 dans la régulation de l'expression d'ADAM12 par le TGF $\beta$  démontrant l'implication des modifications épigénétiques de la chromatine (Barter et al., 2010). En effet, l'histone déacétylase HDAC3 est induite suite à un traitement au TGF $\beta$  via les voies ERK et PI3K et permet de réguler positivement l'expression d'ADAM12 en favorisant une conformation ouverte de la chromatine. En parallèle de ces travaux, une séquence conservée en 5'UTR du gène humain d'ADAM12 agissant comme un répresseur transcriptionnel a été identifiée (Ray et al., 2011). Il s'agit d'une séquence NRE (negative response element) contenant de multiples répétitions dinucléotidiques capables d'adopter une conformation appelée Z-DNA. Cette séquence est capable de fixer MeCP2 (methylCpG binding protein 2) et coopère avec NF1, qui se fixe en amont de la séquence Z-DNA, pour exercer un effet inhibiteur sur la transcription d'ADAM12 (Ray et al., 2012). De façon intéressante, SnoN (Solomon et al., 2010) et les complexes Z-DNA/MeCP2/NF1 sont diminués dans des lignées cancéreuses du sein comparées à des lignées mammaires normales (Ray et al., 2011, 2012) suggérant que ces deux systèmes contribuent à la dérégulation de l'expression d'ADAM12. Les récentes observations sur le rôle de TIF1 $\gamma$ , un inhibiteur de SMAD4, sont en accord avec le concept de dérégulation du gène ADAM12 pour expliquer l'induction de son expression. En effet cette étude montre que l'inactivation de TIF1 $\gamma$  induit spontanément la transition épithélio-mésenchymateuse et conduit à l'expression de nombreux gènes parmi lesquels ADAM12 est le plus induit (Hesling et al., 2011).

### 2.3) Régulation post-transcriptionnelle

Il a été montré que la forme ADAM12L mais pas la forme ADAM12S pouvait être surexprimée dans certains cancers (Kodama et al., 2004; Rocks et al., 2006), suggérant une régulation de l'épissage alternatif d'ADAM12. Néanmoins, ce type de régulation n'a jamais été prouvé. En revanche, les ARNm codant pour ces deux isoformes ont des régions 3' non traduites différentes et une régulation préférentielle de la stabilité de l'ARNm d'ADAM12L impliquant les microARN a pu être montrée dans différents modèles.



**Figure 26 : Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle d'ADAM12.**

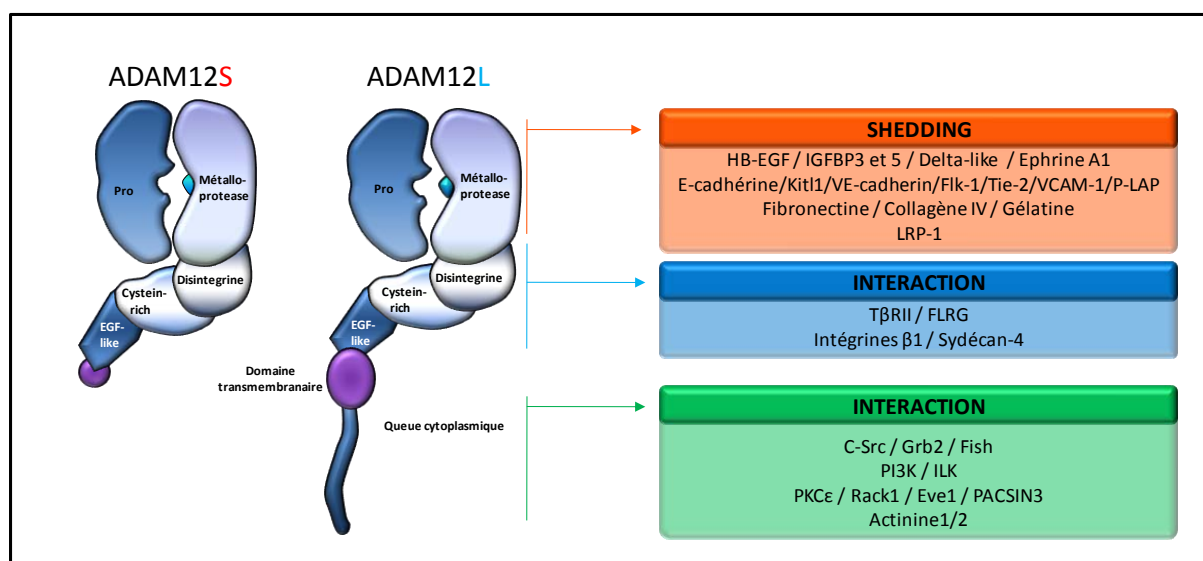
En 2011, Li et al ont décrit un mécanisme de régulation en cascade où la surexpression de Notch1 induit l'activation de NFκB qui régule négativement miR-29a qui lui-même régule négativement l'expression d'ADAM12L (**Figure 26**). De façon surprenante, la surexpression de la forme constitutivement active de Notch1 dans des cellules de rein embryonnaire humaines (HEK 293) et des cellules de tumeur mammaire humaine (MCF7) induit l'expression de la forme membranaire d'ADAM12 alors que la forme courte n'est pas significativement induite. Le variant court d'ADAM12 n'a pas la séquence cible pour le miR-29a dans son extrémité 3'-UTR et n'est donc pas sensible aux régulations post-transcriptionnelles par Notch (Li et al., 2011). Ces résultats ont été confirmés très récemment dans des lignées de cancers mammaires où l'expression de miR200b/c, miR29b/c et miR30d



est inversement corrélée uniquement avec l'expression d'ADAM12L dans des lignées de cancers mammaires. La surexpression de ces miR dans les cellules exprimant ADAM12L (et donc avec une faible expression endogène de ces mêmes miR) inhibe drastiquement l'expression protéique d'ADAM12L mais pas d'ADAM12S (Duhachek-Muggy and Zolkiewska, 2015). A noter que le TGF $\beta$  est aussi un régulateur négatif des miR200 et miR29 (Wendt et al., 2009) suggérant une répression possible de ces miR dans l'induction de l'expression d'ADAM12 en réponse au TGF $\beta$ .

### III) ADAM12, une protéine multidomaine et multifonctionnelle

A l'instar des autres protéines ADAM, ADAM12 possède une structure composée d'un pro-domaine, un domaine métalloprotéase, un domaine disintégrine, un domaine riche en cystéines, un domaine EGF-like, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (Figure 27). Le variant sécrété ADAM12S retrouvé chez l'homme ne possède pas les deux derniers domaines qui sont remplacés par une séquence de 33 acides aminés en C-terminal (Gilpin et al., 1998). Chacun de ces domaines possède une activité propre leur permettant d'assurer une fonction complexe d'interface entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire (Figure 27 et Figure 28).



**Figure 27 : ADAM12 : Structure et Domaines fonctionnels.**

*Le domaine catalytique d'ADAM12L et d'ADAM12S est actif et clive différents types de substrats impliqués dans la signalisation cellulaire, les contacts inter-cellulaires ou qui sont des constituants de la MEC. Les domaines disintégrine, riche en cystéine, EGF-like ainsi que la queue cytoplasmique interagissent avec de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, l'adhésion et l'organisation du cytosquelette. La liste des protéines décrites est valable pour ADAM12S, ADAM12L ou les deux variants.*



La sécrétion d'ADAM12S ne semble pas être soumise à régulation et est donc sécrétée de façon constitutive. En revanche, la localisation membranaire d'ADAM12L est soumise à une régulation qui va en partie déterminer son activité, à la fois vis à vis de ses substrats et vis à vis de ses interactants. Nous verrons dans la partie suivante quels types de signaux peuvent induire une translocation d'ADAM12L à la membrane.

### **3.1) Maturation et trafic intracellulaire d'ADAM12**

#### ***a) Maturation d'ADAM12***

ADAM12 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique granuleux et est maturée dans l'appareil de Golgi. Au cours de son passage dans le réseau trans-golgien, ADAM12 est clivée par une furin-like proprotéine convertase au niveau de son prodomaine, ce qui permet son activation catalytique (Loechel et al., 1998). La présence de ce pro-peptide est nécessaire à son transport vers la membrane plasmique, probablement parce qu'il lui confère un repliement correct (Loechel et al., 1999). De façon surprenante, le prodomaine reste lié de façon non-covalente après clivage dans le trans-golgi (Wewer et al., 2006). La forme membranaire ADAM12L est retenue dans le réseau trans-golgi et sa rétention nécessite à la fois la queue cytoplasmique et le domaine transmembranaire alors que les domaines de liaison de type SH3 ne sont pas nécessaires (Hougaard et al., 2000). En accord avec ces observations, un mutant ADAM12L dont le domaine cytoplasmique a été délété, est spontanément transloqué à la membrane. Cette spécificité a été confirmée dans des études où le remplacement de la partie cytoplasmique d'ADAM12L par celle d'ADAM9 induit sa translocation membranaire démontrant la spécificité de la queue cytoplasmique d'ADAM12 dans le contrôle de la rétention (Cao et al., 2003). Il est à noter qu'une surexpression de la protéine couplée à la GFP conduit à une accumulation de la protéine en zone périnucléaire avec une fraction très minoritaire à la membrane (Hougaard et al., 2000).

#### ***b) Translocation membranaire en réponse aux intégrines***

Les premières données sur la régulation du transport membranaire d'ADAM12L ont été apportées par l'équipe d'Ulla Wewer sur des cellules mésoenchymateuses de rhabdomyosarcome. Suite à un traitement au phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), connu pour activer les protéines kinases C (PKC), ADAM12L interagit avec l'isoforme **PKC $\epsilon$**  puis est transloquée à la membrane (**Figure 28**). Ce phénomène est dépendant de l'activité de phosphorylation de PKC $\epsilon$ , bien qu'aucune phosphorylation d'ADAM12L n'ait été mise en

évidence (Sundberg et al., 2004). Notre laboratoire a identifié par crible double hybride un autre interagtant d'ADAM12L, **Rack1**, qui forme un complexe ternaire avec ADAM12L et PKC $\epsilon$  dans des cellules étoilées hépatiques (Bourd-Boittin et al., 2008). La stimulation de ces cellules par le collagène I, composant majeur du microenvironnement fibrotique et tumoral, induit la translocation membranaire d'ADAM12L de façon dépendante de PKC $\epsilon$ /Rack1, et des **intégrines  $\beta$ 1**. De façon intéressante, l'intégrine  $\beta$ 1 est elle-même un interagtant d'ADAM12L et la formation de ce complexe pourrait résulter de la translocation membranaire dépendante de Rack1 (Kawaguchi et al., 2003).

#### *c) Translocation membranaire en réponse aux récepteurs couplés aux protéines G*

Parmi les nombreux interagtant d'ADAM12L, deux protéines associées aux mécanismes d'endocytose, **PACSIN3** et **Eve-1** interagissent avec le domaine P2 (domaine riche en prolines) d'ADAM12L situé dans la queue cytoplasmique, et sont impliquées dans le clivage des ligands immatures de l'EGFR par ADAM12 en réponse à une activation des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Mori et al., 2003; Tanaka et al., 2004) (**Figure 28**). PACSIN3 et Eve-1 qui sont aussi capables de se lier à ADAM9, ADAM10, ADAM15 et ADAM19 permettent à la cellule de transactiver le signal des GPCR vers l'EGFR. Ainsi, l'inhibition de PACSIN3 et Eve-1 conduit à la diminution du shedding des ligands immatures de l'EGFR (pro-HB-EGF, pro-TGF $\alpha$ , pro-amphiregulin, pro-epiregulin) induit par le traitement au 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Les rôles de PACSIN3 et Eve-1 dans le trafic intracellulaire suggèrent que ces protéines puissent permettre le clivage de substrats d'ADAM12L en favorisant sa translocation membranaire en réponse à un signal des GPCRs.

#### *d) Relocalisation d'ADAM12L dans les domaines membranaires spécialisés, podosomes, invadosomes et radeaux lipidiques*

Il a été montré qu'ADAM12L interagit directement avec **c-Src** (Kang et al., 2000; Suzuki et al., 2000) (**Figure 28**). c-Src est le prototype de la famille des tyrosine kinases non récepteurs qui est composée de 9 membres chez les vertébrés Src, Yes, Fgr, Frk, Fyn, Lyn, Hck, Lck and Blk. Les signaux impliquant les kinases de type Src contrôlent une très grande variété de processus biologiques comme la prolifération, la différenciation, la motilité et l'adhésion. Ces kinases contiennent un domaine N-terminal d'ancrage à la membrane et deux domaines SH3 et SH2 impliqués dans l'association et l'activation de substrats. c-Src a deux fonctions importantes : comme tyrosine kinase, elle phosphoryle des substrats

spécifiques et comme protéine adaptatrice, elle se lie à des protéines via les domaines SH2 et SH3 positionnant ainsi l'activité tyrosine kinase à l'intérieur de complexes moléculaires.

L'interaction entre ADAM12L et c-Src met en jeu le domaine SH3 de c-Src et le domaine P2 riche en proline d'ADAM12L, et induit la phosphorylation d'ADAM12L. ADAM12L et c-Src sont alors relocalisés dans des structures riches en actine à la périphérie cellulaire (Stautz et al., 2010). Ces structures ont été identifiées comme des invadosomes, structures riches en actine présentes à la surface cellulaire et conférant aux cellules cancéreuses des capacités de migration et de dégradation de la matrice extracellulaire. Ces invadosomes requièrent l'interaction d'ADAM12L avec c-Src ainsi que la présence de l'intégrine  $\alpha v \beta 3$ . Ces structures contiennent des protéines associées aux radeaux lipidiques, la cavéoline-1 et MMP14, et la déplétion du cholestérol empêche la formation des invadosomes (Albrechtsen et al., 2011). Plus récemment, il a été montré que le domaine cytoplasmique d'ADAM12L permet la relocalisation de MMP14 au niveau des invadosomes facilitant ainsi la dégradation de la MEC et une protection contre l'apoptose (Albrechtsen et al., 2013). Cette régulation de la MMP14 implique l'intégrine  $\alpha v \beta 3$ .

A noter que la protéine adaptatrice **Fish**, un substrat de Src, interagit aussi avec ADAM12 et les deux protéines sont colocalisées dans les podosomes des cellules murines NIH3T3 transformées par Src (Abram et al., 2003).

Par ailleurs, une approche protéomique a récemment permis d'identifier ADAM12 comme la protéine la plus relocalisée dans les radeaux lipidiques de cellules souches mésenchymateuses humaines suite à un traitement au TGF $\beta$ . Dans ce contexte, l'inhibition d'ADAM12L par siRNA abroge la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules musculaires lisses induite par le TGF $\beta$  (Kim et al., 2012).

#### *e) Internalisation constitutive d'ADAM12L*

La présence d'ADAM12L à la surface cellulaire est essentielle pour exercer son activité de shedding bien que cette condition ne semble pas suffisante (Stautz et al., 2012a). Nous venons de voir quels types de signaux pouvaient relocaliser ADAM12L à la membrane plasmique, néanmoins ADAM12L peut aussi être internalisée. Ainsi, il a pu être montré qu'ADAM12L était internalisée constitutivement par un mécanisme dépendant des clathrines et de la protéine adaptatrice **Grb2**. Cette dernière interagit avec ADAM12L par le même domaine que c-Src, à savoir le domaine riche en prolines P2 et dans une moindre mesure avec le domaine P3. La

déplétion en cholestérol par un traitement au Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine modifie la localisation d'ADAM12L mais n'intervient pas dans son internalisation (Stautz et al., 2012a).

### **3.2) Activité métalloprotéasique d'ADAM12L et d'ADAM12S**

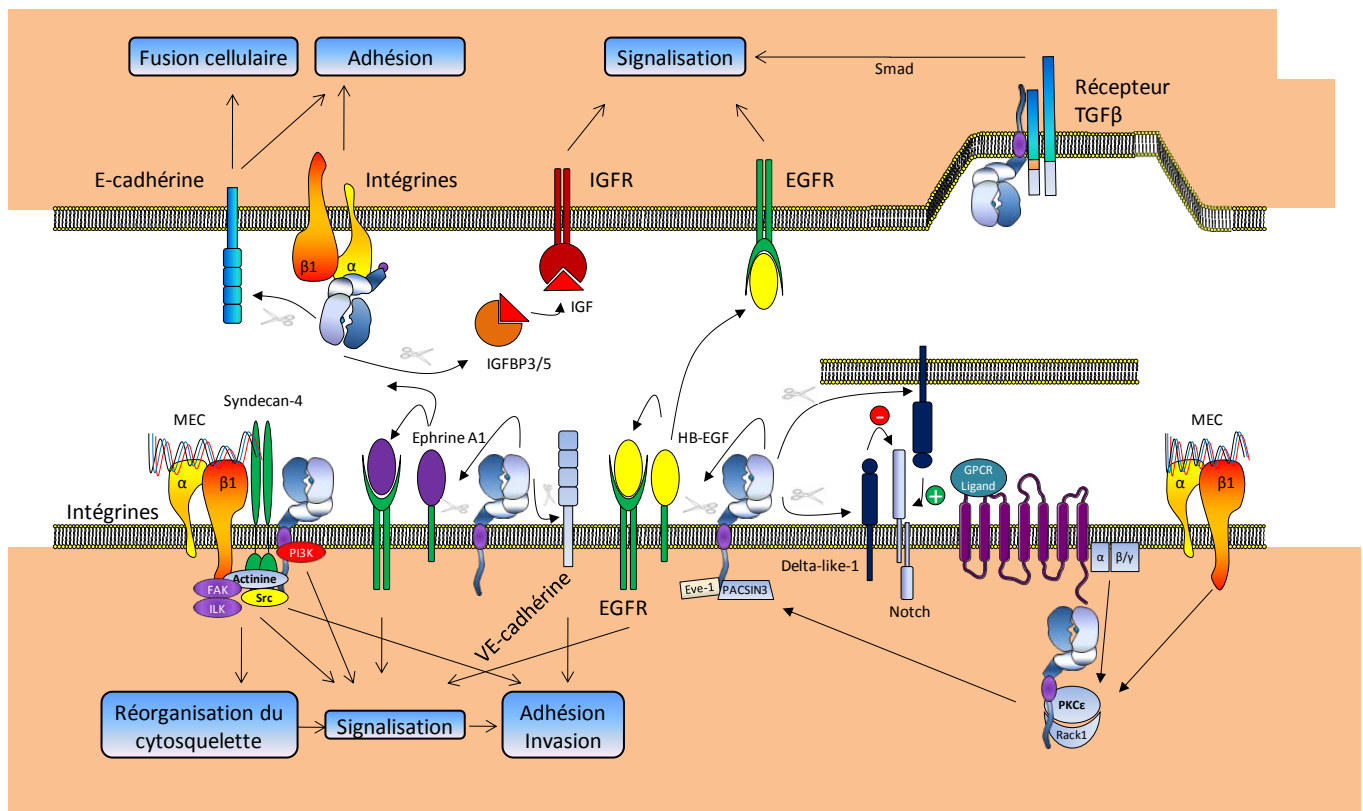
#### ***a) ADAM12 est une métalloprotéase active***

Comme les MMPs, ADAM12 possède une séquence consensus de liaison au zinc HEXXHXXGXXH, prédite pour avoir une activité métalloprotéasique active. Les études de cristallographie sur ADAM17/TACE et ADAM33 ont montré une structure semblable à celle des MMPs avec la présence caractéristique d'une structure appelée « met-turn » retrouvée chez les metzincins (**Figure 22**). L'activité métalloprotéasique d'ADAM12L est gardée inactive par un mécanisme appelé « cystein-switch » commun avec les MMPs. La cystéine présente au niveau du prodomaine interagit avec l'ion zinc présent au niveau du site catalytique. Le clivage du prodomaine par une furine au cours de la maturation dans l'appareil de golgi libère l'ion zinc ce qui rend ADAM12 active (Cao et al., 2002; Loechel et al., 1999). Cependant, le cystein-switch est inactif dans le cas d'autres ADAMs, notamment ADAM10 et ADAM17/TACE (Leonard et al., 2005; Moss et al., 2007).

#### ***b) Substrats d'ADAM12***

##### **Voie de signalisation de l'insuline**

Des études *in vitro* ont montré qu'ADAM12S mais pas ADAM12L était capable de cliver l'IGFBP3 et l'IGFBP5 (**Figure 28**), des protéines impliquées dans la séquestration des facteurs de croissance insuline-like IGF-I et IGF-II (Loechel et al., 2000; Shi et al., 2000). Le clivage de l'IGFBP3/5 implique une interaction avec ADAM12S qui est dépendante du domaine disintégrine et est inhibée par TIMP3. Dans les circonstances normales, IGFBP3 est présente dans le plasma sous forme complète, mais chez la femme enceinte, l'IGFBP3 est clivée, ce qui augmente la biodisponibilité de l'IGF. L'IGF I et II ont un rôle majeur dans la croissance fœtale, la trisomie 21 (syndrome de Down) et la trisomie 18. Ainsi, un niveau faible d'ADAM12S dans le sérum de femmes enceintes est un marqueur de mauvais pronostic pour la trisomie 21 et de la trisomie 18 (Laigaard et al., 2005a, 2006). Par ailleurs, il a été montré que le clivage de l'IGFBP5 par ADAM12S était impliqué dans la prolifération des chondrocytes, avec pour conséquence, une érosion ostéoarthritique des cartilages (Okada et al., 2008).



**Figure 28 : Schéma non exhaustif des fonctions d'ADAM12L et d'ADAM12S potentiellement impliquées dans le cancer.**

*Pour une meilleure lisibilité, la figure est disponible en Annexe 1.*

### Voie de signalisation de l'EGF

Il a été montré qu'ADAM12L régule le clivage de plusieurs ligands impliqués dans l'activation de la voie EGFR. Ainsi, ADAM12L peut cliver le **pro-HB-EGF** dans des cardiomyocytes stimulés par des agonistes des GPCR et favoriser l'hypertrophie cardiaque (Asakura et al., 2002) (**Figure 28**). De même, le clivage du pro-HB-EGF induit par des esters de phorbol est diminué dans des fibroblastes de souris pour lesquels ADAM12 est inhibée (Kurisaki et al., 2003). Une autre étude a pu mettre en évidence le clivage de pro-HB-EGF dans les cellules épithéliales bronchiques, stimulant ainsi leur prolifération et diminuant leur apoptose (Rocks et al., 2008). De plus, d'autres ligands de l'EGFR peuvent être clivés par ADAM12 *in vitro* tels que l'**EGF**, la **betacelluline** (Horiuchi et al., 2007) ou encore l'**amphiréguline** (Roy and Moses, 2012). La pertinence de ces données dans un contexte physiologique reste controversée. En effet, les résultats obtenus par différentes équipes varient selon le type cellulaire, selon l'expression endogène ou exogène ou selon l'approche expérimentale utilisée (gain ou perte de fonction). De même, le clivage de l'amphiréguline par ADAM12 n'a pu être observé qu'en absence d'ADAM10 (Roy and Moses, 2012). Par

ailleurs, il a été montré que le clivage des ligands de l'EGFR par ADAM12 en réponse à une activation des GPCR impliquait les protéines PACSIN3 et Eve-1 (voir paragraphe 2.1)c)).

### **Voie de signalisation Notch**

Le ligand **Delta-like 1** (DLL1) est l'un des 5 ligands du récepteur Notch, récepteur clé impliqué dans le développement de l'organisme. L'activation de Notch est particulière puisque l'association de DLL1 en cis ou en trans aboutit respectivement à l'inhibition et l'activation de la voie de signalisation Notch. Ainsi, le clivage de DLL1 par ADAM12 en cis lève l'inhibition exercée sur Notch permettant l'activation de la voie de signalisation (Dyczynska et al., 2007) (**Figure 28**). Puisque Notch induit l'expression d'ADAM12L (Li et al., 2011), une boucle de régulation positive se met alors en place. A l'inverse, le shedding de DLL1 par ADAM12 en trans lors de la différenciation myogénique contribue à l'inactivation de la voie Notch facilitant ainsi la progression dans la différenciation (Sun et al., 2008).

### **Autres types de clivages**

Outre ses capacités à libérer des ligands, ADAM12 peut aussi cliver des récepteurs membranaires. En effet, il a été montré qu'ADAM12L clive la protéine **LRP-1** (Low-density lipoprotein receptor-related protein-1), un large récepteur membranaire impliqué entre autre dans la clairance des protéases matricielles, l'endocytose ou encore la signalisation cellulaire (Etique et al., 2013; Selvais et al., 2011). De façon intéressante, ce clivage a lieu dans des domaines membranaires pauvres en cholestérol.

Très récemment, il a été montré que la **E-cadhérine** pouvait être clivée par ADAM12S permettant ainsi la fusion des trophoblastes (**Figure 28**), un processus nécessaire aux bonnes fonctions placentaires (Aghababaei et al., 2015). L'inhibition de la protéine kinase A (PKA), annule l'activation transcriptionnelle d'ADAM12L et d'ADAM12S ainsi que la fusion des trophoblastes.

La protéine **P-LAP** (Placental Leucine Aminopeptidase) est une enzyme capable de dégrader l'oxytocine, hormone favorisant le travail et l'accouchement. Elle existe sous forme membranaire au niveau du placenta et sous forme sécrétée dans le sérum maternel. Son niveau atteint son maximum au terme de la grossesse. La recherche d'enzymes pouvant cliver P-LAP a permis de mettre en évidence les protéines ADAM comme sheddases potentielles puisque l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des MMPs tels que TIMP1 et TIMP2 n'ont pas d'effet sur le clivage de P-LAP alors que l'inhibition des ADAMs réduit son clivage (Ito et al., 2004). De cette manière, il a été montré qu'ADAM9 et ADAM12, qui sont fortement exprimées dans le placenta, sont impliquées dans le clivage de P-LAP au cours de la grossesse.

Cinq nouveaux substrats ont été récemment identifiés : **Kitl1**, **VE-cadhérine** (vascular endothelial cadherin) (**Figure 28**), **Flk-1** (fetal liver kinase 1), **Tie-2**, and **VCAM-1** (vascular cell adhesion molecule 1), des protéines membranaires impliquées dans l'adhésion et dont les 4 dernières sont exclusivement exprimées par les cellules endothéliales (Fröhlich et al., 2013). Ce clivage est exclusivement médié en cis par ADAM12L. *In vivo*, l'expression d'ADAM12 a été retrouvée dans les vaisseaux de tumeurs mammaires, mais pas dans les vaisseaux de tissus mammaires normaux suggérant une fonction d'ADAM12 dans la néovascularisation tumorale. Par ailleurs, ADAM12L est capable de cliver **l'ephrine A1**, un ligand des récepteurs Eph à activité tyrosine kinase impliquée dans la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la néovascularisation (Ieguchi et al., 2013) (**Figure 28**).

Finalement, il a été montré qu'ADAM12S dégrade plusieurs composants de la matrice extracellulaire incluant la **fibronectine**, le **collagène de type IV**, et la **gélatine** mais pas le collagène de type I ni la caséine (Roy et al., 2004). Ces données suggèrent qu'ADAM12 pourrait participer au remodelage matriciel, néanmoins une autre étude n'a pas pu confirmer une activité sur les substrats cités ci-dessus (Jacobsen et al., 2008). En revanche, cette étude a permis de montrer le clivage par ADAM12S de la **transferrine S-Carboxyméthylée**, substrat bien connu des MMPs.

### 3.3) Fonctions indépendantes de l'activité métalloprotéase

#### *a) Interaction avec des molécules d'adhésion*

##### **Interactions avec les intégrines**

Les interactions entre les cellules jouent un rôle majeur, et les intégrines participent largement aux processus d'adhésion cellule/MEC et cellule/cellule. Les études d'Eto et ses collaborateurs ont permis d'identifier l'interaction entre ADAM12 et **l'intégrine  $\alpha 9 \beta 1$**  (**Figure 28**), de façon indépendante du motif classique d'interaction RGD présent dans les intégrines (Eto et al., 2000). Cette interaction repose sur la séquence R(X6)DLPEF présente dans la boucle disintégrine de nombreuses ADAMs (Eto et al., 2002). ADAM10 et ADAM17 qui n'ont pas cette séquence ne peuvent pas se lier à l'intégrine  $\alpha 9 \beta 1$  (Eto et al., 2000). De façon intéressante, cette interaction requiert l'activation de l'intégrine grâce à la présence d'ions bivalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ ), comme c'est le cas pour l'interaction des intégrines avec de nombreux ligands de la MEC. Dans ce contexte d'interaction, l'étalement des cellules nécessite l'activation de la PI3K, autre interactant d'ADAM12L (Thodeti et al., 2005). L'interaction d'ADAM12 et de l'intégrine  $\alpha 9 \beta 1$  est physiologiquement importante puisque



l'adhésion médiée par cette interaction est indispensable à la différenciation des cellules myogéniques (Lafuste et al., 2005). Bien que l'intégrine  $\alpha 9\beta 1$  semble être l'intégrine privilégiée, ADAM12 peut interagir avec d'autres intégrines en son absence. En effet, l'utilisation d'anticorps bloquant l'intégrine  $\alpha 9$  n'inhibe que partiellement l'adhésion des cellules ensemencées sur des boîtes recouvertes de protéines ADAM12 recombinantes. Il en va de même pour les intégrines  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$ . En revanche, l'utilisation d'anticorps bloquant l'intégrine  $\beta 1$  inhibe totalement l'adhésion cellulaire. De plus, dans des cellules de carcinome, qui n'expriment pas l'intégrine  $\alpha 9\beta 1$ , les cellules sont tout de même capables d'adhérer à ADAM12 suggérant l'implication d'autres intégrines  $\alpha$  dans l'adhésion cellulaire (Thodeti et al., 2005).

Effectivement, il a été montré que les domaines disintégrine et riches en cystéines d'ADAM12 interagissent avec **l'intégrine  $\alpha 7\beta 1$** , la principale intégrine liant la laminine, et jouant un rôle important dans le développement, la régénération et les pathologies musculaires. L'implication de ces interactions dans l'adhésion cellulaire a été confirmée dans des myoblastes de rat et nécessite la présence de  $Mn^{2+}$ , qui n'est pas requise pour une interaction de forte affinité avec la laminine (Zhao et al., 2004). En conséquence, l'induction de l'activation de la tyrosine kinase FAK, l'un des premiers effecteurs des intégrines, est plus faible lors d'une interaction avec ADAM12 comparée à la laminine. Par ailleurs, il a été montré dans un modèle murin de dystrophie musculaire de Duchenne (maladie génétique causée par une inactivation fonctionnelle de la dystrophine), que la surexpression d'ADAM12 permettait de compenser les effets de la pathologie à court terme (Kronqvist et al., 2002). L'analyse des mécanismes sous-jacents montre que la surexpression d'ADAM12 dans les muscles squelettiques augmente l'expression et la relocalisation extrasynaptique de composants des complexes d'adhésion cellulaire musculaire tels que l'intégrine  $\alpha 7\beta 1$  et de l'utrophine, un homologue fonctionnel de la dystrophine (Moghadaszadeh et al., 2003).

### **Interaction avec les syndecans**

Les syndecans (1 à 4) constituent un des principaux groupes de la famille des protéoglycanes à héparanes sulfates transmembranaires, protéines de surface constituées d'un corps protéique attaché de façon covalente à un ou plusieurs héparanes sulfates glycosaminoglycane. Le domaine extracellulaire des syndecans est très variable et possède de trois à cinq héparanes sulfates différents. Ils participent à l'établissement des points d'adhésion focaux et sont des co-récepteurs de nombreux ligands de la matrice extracellulaire. Le domaine cytoplasmique des syndecans extrêmement bien conservé, est composé de deux régions constantes C1 et C2



et d'une région variable V. Seuls les syndécans-4 possèdent dans leur domaine intracellulaire un site de 7 résidus aminoacides liant le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) impliqué dans l'activation de la PKC $\alpha$  indispensable à l'étalement cellulaire et la réorganisation du cytosquelette.

Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 sont capables d'adhérer au domaine recombinant riche en cystéine d'ADAM12L via une interaction avec un héparane sulfate, plus tard identifié comme le **syndécan-4** (Iba et al., 1999, 2000) (**Figure 28**). Cette interaction permet aux cellules de s'attacher mais pas de s'étaler. L'étalement des cellules nécessite l'activation de l'intégrine  $\beta 1$ , par un mécanisme impliquant l'activation de la PKC $\alpha$  et de RhoA (Thodeti et al., 2003).

Par ailleurs, il a été montré que les héparanes sulfates glycosaminoglycans (HSGAG) étaient aussi impliqués dans la régulation de l'activité protéase d'ADAM12. En effet, les héparanes sulfates, l'héparine ainsi que les protéoglycans de surface peuvent se fixer sur le prodomaine et le domaine métalloprotéase d'ADAM12 et empêcher l'activation de son domaine catalytique, comme démontré par une diminution du clivage du pro-EGF et de l'IGFBP3 (Sørensen et al., 2008).

### ***b) Interaction avec des molécules de signalisation intracellulaire***

#### **Voies de signalisation PI3K et ILK**

L'influence d'ADAM12 sur la signalisation cellulaire fait intervenir de nombreux mécanismes et affecte soit la libération des ligands de signalisation, soit la cascade de signalisation elle-même. Ainsi, le rôle d'ADAM12S est principalement lié à son activité protéolytique conduisant à la libération de facteurs de croissance stockés dans la MEC. Les effets de la forme membranaire ADAM12L sont plus complexes. Nous avons déjà vu qu'ADAM12L peut interagir avec la kinase c-Src via sa queue cytoplasmique permettant ainsi une relocalisation des protéines au niveau de régions particulières de la membrane (Stautz et al., 2010). Les mêmes auteurs ont identifié une interaction avec une autre protéine de signalisation, la **PI3K** (**Figure 28**). Cette kinase, qui peut être activée par les récepteurs à activité tyrosine kinase mais aussi par le récepteur à activité sérine/thréonine kinase du TGF $\beta$ , joue des rôles majeurs dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la survie, la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire. L'interaction entre ADAM12L et la PI3K est directe et fait intervenir les domaines P1, P2 et P5 riches en proline d'ADAM12 avec un domaine SH3 de la sous-unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3K (Kang et al., 2001). L'utilisation d'une protéine de fusion GFP contenant le domaine PH (Pleckstrin Homology) de fixation au PIP3 a permis de

montrer un rôle potentiel d'ADAM12L dans l'activation de la PI3K. Cette activation pourrait être médiée par une relocalisation de la PI3K au niveau de ses substrats lipidiques. De façon intéressante, notre équipe a récemment identifié **ILK** comme un nouvel interagissant d'ADAM12L et démontré que l'expression d'ADAM12L induit la voie de signalisation associée à la survie cellulaire via l'induction de la cascade PI3K, AKT, GSK3 $\beta$  de façon dépendante d'ILK et de l'intégrine  $\beta$ 1 (Leyme et al., 2012) (**Figure 28**).

#### **ADAM12 est un régulateur de la voie TGF $\beta$**

**FLRG** (follistatin-related gene) est une glycoprotéine sécrétée semblable à la follistatine qui joue un rôle de séquestration de l'activine A, ligand du récepteur au TGF $\beta$ . L'équipe de Ruth Rimokh a montré qu'ADAM12S, et potentiellement ADAM12L, pouvait interagir avec FLRG et la follistatine via son domaine riche en cystéines (Bartholin et al., 2005). Plusieurs études ont montré un rôle d'ADAM12 et de l'activine A dans la différenciation des ostéoclastes (Abe et al., 1999; Boissy et al., 2003; Koseki et al., 2002; Verrier et al., 2004). Cette étude indique que FLRG pourrait contribuer à la formation des os en inhibant la différenciation des ostéoclastes.

Notre laboratoire a par ailleurs montré une implication directe d'ADAM12 dans la signalisation du TGF $\beta$ . En effet, ADAM12 interagit avec la partie extracellulaire du récepteur de type II au TGF $\beta$  (**T $\beta$ RII**) et favorise l'activation des voies SMAD en permettant l'internalisation clathrine-dépendante du récepteur et le protégeant de sa dégradation (Atfi et al., 2007) (**Figure 28**). L'utilisation d'un modèle bioinformatique s'appuyant sur des données biologiques qualitatives a permis de montrer qu'ADAM12 augmente le taux d'internalisation des récepteurs du TGF $\beta$  et prolonge leur signalisation (Gruel et al., 2009).

## **IV) Physiopathologie d'ADAM12**

### **4.1) Développement**

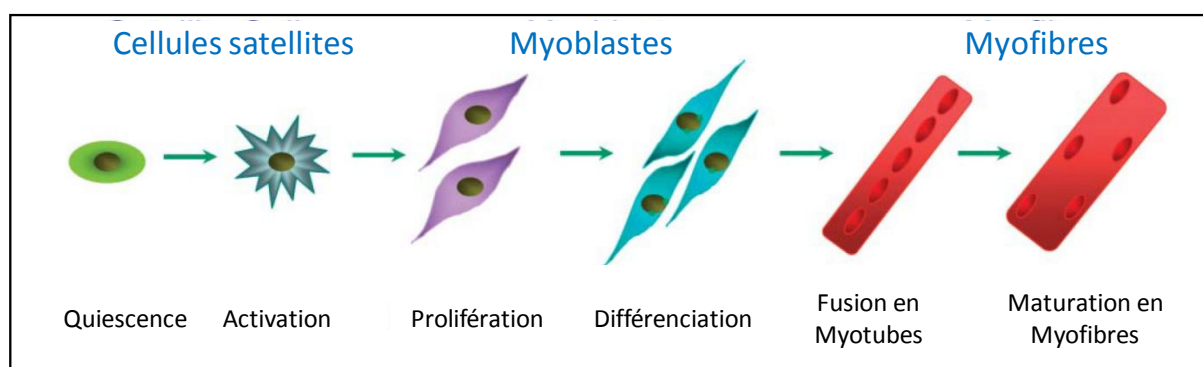
L'expression d'ADAM12 au cours du développement embryonnaire chez la souris est essentiellement retrouvée dans les cellules mésenchymateuses condensées à l'origine des muscles squelettiques, des os et des viscères (Kurisaki et al., 1998). L'équipe de Kurisaki et ses collègues a néanmoins mis en évidence que seulement 30% des souris dont le gène *Adam12* est invalidé meurent avant le sevrage, la plupart au cours de la première semaine (Kurisaki et al., 2003). En revanche, les souris viables sont normales et fertiles. Elles ne présentent pas de défauts musculaires ou de problèmes dans la régénération des muscles squelettiques. Quelques souris présentent une réduction du tissu adipeux brun, mais ce

phénotype reste rare. Le tissu adipeux brun fait partie des deux types de tissus adipeux avec le tissu adipeux blanc. Il est responsable de la thermorégulation, en particulier chez les nouveau-nés qui ne peuvent pas frissonner, mais est aussi présent chez l'adulte. Les 30% de létalité chez les souris ADAM12<sup>-/-</sup> pourraient être dus à une mauvaise thermorégulation liée à une diminution du tissu adipeux brun chez les souriceaux.

Compte tenu des multiples mécanismes impliquant ADAM12, la survie des souris *Adam12*<sup>-/-</sup> suggère des mécanismes compensatoires comme pour les autres protéines ADAMs (Horiuchi et al., 2005). De façon étonnante, des souris triple KO *Adam9/Adam10/Adam12* sont viables et fertiles alors que l'inactivation du seul gène *Adam10* est létale, suggérant une grande plasticité dans ces phénomènes de compensation (Sahin et al., 2004).

#### 4.2) Myogenèse et dystrophie musculaire

Le développement des muscles squelettiques implique la formation de myotubes multinucléés résultant de la fusion des myoblastes (Figure 29). Ce processus nécessite la fusion des membranes plasmiques et les protéines transmembranaires telles que les intégrines et les cadhérines jouent un rôle majeur.



**Figure 29 : Différents stades de la myogenèse.**

*Les cellules satellites sont quiescentes dans le muscle adulte normal et peuvent être activées par exemple suite à un dommage musculaire. Une fois activées, les cellules satellites prolifèrent et produisent des myoblastes, qui prolifèrent à leur tour avant de fusionner en myotubes qui mûrissent en myofibres (Adapté de Zammit et al., 2006).*

Comme révélé dans les premières études sur ADAM12, celle-ci est nécessaire à la fusion des myoblastes (Gilpin et al., 1998; Yagami-Hiromasa et al., 1995). L'implication d'ADAM12 dans la myogenèse a ensuite été renforcée par les observations des souris *Adam12*<sup>-/-</sup> qui présentent une déficience au niveau des muscles intracapsulaires du cou (Kurisaki et al., 2003). En utilisant un modèle de fusion des myoblastes (cellules C2C12), l'équipe de Engvall a montré que l'expression d'*Adam12*, mais pas d'*Adam9/10/15/17/19*, est induite au moment de la fusion des myotubes, un processus nécessitant l'interaction d'ADAM12 avec l' $\alpha$ -

**actinine-2** (Galliano et al., 2000). *In vitro*, l'expression d'*Adam12* est associée à l'activation des cellules satellites musculaires murines quiescentes favorisant la régénération musculaire et est impliquée dans la formation des myotubes (Borneman et al., 2000).

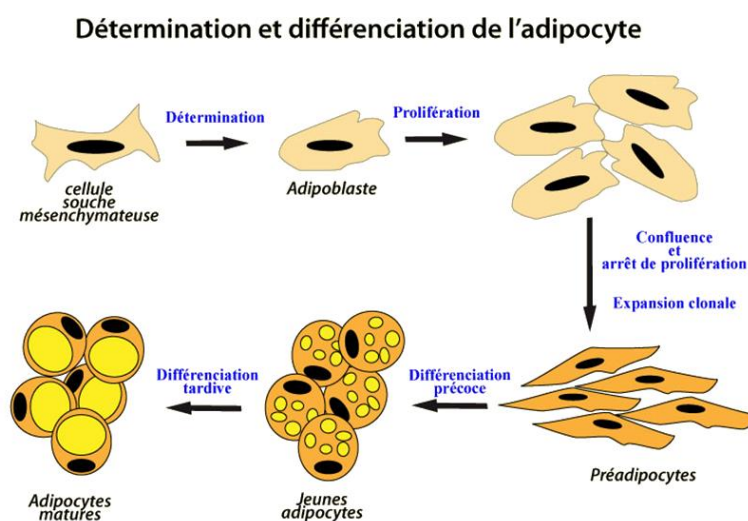
Etant donné l'implication d'ADAM12 dans la myogenèse et la régénération musculaire, des études ont tenté d'utiliser ces propriétés pour réparer des déficiences musculaires. Ainsi, chez des souris déficientes en dystrophine (modèle mdx), la surexpression d'ADAM12 réduit la nécrose et l'inflammation des tissus musculaires (Kronqvist et al., 2002). ADAM12 semble compenser le déficit en dystrophine en augmentant l'expression et la relocalisation extrasynaptique de l'intégrine  $\alpha 7$  et de l'utrophine, homologue fonctionnel de la dystrophine, renforçant et stabilisant les membranes plasmiques (Moghadaszadeh et al., 2003). Néanmoins, l'effet d'ADAM12 n'est pas stable et le traitement des souris mdx avec le transgène ADAM12 pendant un an conduit à la perte de muscle squelettique et de son remplacement par du tissu adipeux et fibreux. De plus, les processus de régénération musculaire sont retardés aggravant la pathologie (Jørgensen et al., 2007). Dans un autre modèle de dystrophie musculaire plus sévère, le modèle déficient en laminine2 dyw, la surexpression d'ADAM12 n'a pas d'effet sur le phénotype clinique malgré une augmentation de la régénération et du nombre de fibres musculaires (Guo et al., 2005). Par conséquent, l'utilisation thérapeutique d'ADAM12 pour lutter contre les déficiences musculaires n'a pas fait l'objet de développement.

### 4.3) Adipogenèse

L'adipogenèse consiste en la différenciation de pré-adipocytes en adipocytes matures (**Figure 30**). Il existe deux types de tissus adipeux : le tissu adipeux blanc, zone de stockage des triglycérides important pour les besoins énergétiques de l'organisme, et le tissu adipeux brun nécessaire à la thermorégulation de l'individu.

Les souris invalidées pour le gène ADAM12 présentent une réduction du tissu adipeux brun suggérant un rôle dans l'adipogenèse (Kurisaki et al., 2003). De plus, les souris surexprimant ADAM12 montrent une invasion adipocytaire au niveau des muscles (Kawaguchi et al., 2002). Les souris femelles présentent une augmentation de poids liée à une augmentation de la masse grasseuse corporelle, tandis que les souris mâles ont une faible augmentation de poids et ne deviennent pas obèses. Il a par ailleurs été montré un rôle d'ADAM12 dans la formation du tissu adipeux blanc chez l'adulte. En effet, les souris *Adam12*  $-/-$  présentent une résistance à la prise de poids suite à un régime riche en graisses (Masaki et al., 2005). La capacité d'ADAM12 à induire la voie de signalisation de l'insuline via une dégradation de l'IGFBP3/5 pourrait expliquer son rôle dans l'adipogenèse. Pourtant, les souris surexprimant

ADAM12S ne présentent pas un excès de clivage de l'IGFBP3 dans le sérum (Kawaguchi et al., 2002). De même, l'inhibition d'ADAM12 dans des fibroblastes embryonnaires murins ne montre pas de différence dans le clivage de l'IGFBP3 (Masaki et al., 2005). En accord avec ces observations, la surexpression d'ADAM12S n'induit pas de modification des paramètres métaboliques tels le taux de cholestérol, d'insuline et de triglycérides (Kawaguchi et al., 2002) et des souris *Adam12*<sup>-/-</sup> soumises à un régime riche en graisse ne présentent pas de troubles métaboliques significatifs (Masaki et al., 2005).



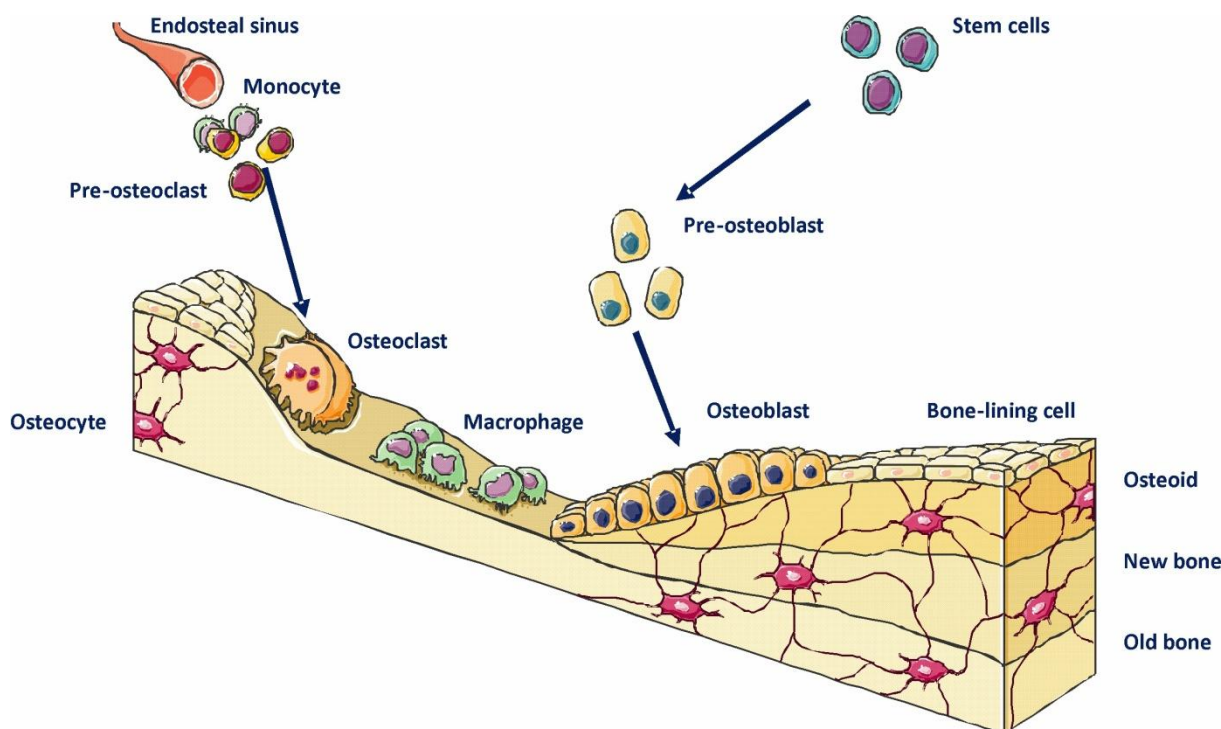
**Figure 30 : Différents stades de l'adipogenèse.**

*Après une phase de croissance, l'adipoblaste atteint la confluence en culture, condition requise pour différenciation en préadipocytes. Les pré-adipocytes se différencient ensuite pour donner les Adipocytes matures. Schéma de [biologiedelapeau.fr](http://biologiedelapeau.fr).*

Les mécanismes moléculaires sous-jacents ont été précisés et il a été montré que l'expression d'ADAM12 est maximale dans les pré-adipocytes et diminue au cours de la différenciation des adipocytes (Kawaguchi et al., 2003). Dans un système de différenciation des adipocytes *in vitro*, la surexpression d'ADAM12L mène à une inhibition des fonctions de l'intégrine  $\beta 1$  conduisant à une réorganisation corticale du cytosquelette d'actine, à une diminution des points d'adhésion focaux et de l'adhésion à la fibronectine.

#### 4.4) Physiologie osseuse

Le tissu osseux est en constant remodelage. Les ostéoblastes et les ostéoclastes sont les deux types cellulaires agissant sur le remodelage osseux en sécrétant de la MEC ou en résorbant l'os respectivement (Figure 31).



**Figure 31 : Remodelage du tissu osseux par les ostéoblastes et les ostéoclastes.**

*Le remodelage du tissu osseux est contrôlé par les ostéoblastes, qui sont responsables de la formation osseuse, et des ostéoclastes, qui sont responsables de la résorption osseuse. Les ostéoblastes proviennent de progéniteurs mésenchymateux via le stade préostéoblaste. Ils peuvent aussi se différencier en ostéocytes qui s'incrustent dans la matrice extracellulaire osseuse. Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées dérivées des macrophages de la moelle osseuse. La balance entre les ostéoblastes et les ostéoclastes contrôle l'homéostasie osseuse. Schéma de Acceleration of New Biomarkers Development and Discovery in Synergistic Diagnostics of Coronary Artery Disease par Ewa Stępień.*

Bien qu'ADAM12 ne soit que faiblement exprimée dans les tissus osseux adultes (Yagami-Hiromasa et al., 1995), une expression importante a été décrite dans les ostéoblastes de souris nouveaux nés (Harris et al., 1997). ADAM12 a finalement été associée à la différenciation des ostéoblastes et à la formation des ostéoclastes en favorisant la fusion cellulaire de leurs précurseurs mononucléaires respectifs (Abe et al., 1999; Inoue et al., 1998). De la même façon, ADAM12 serait impliquée dans la fusion des cellules géantes multinucléées présentes dans les tumeurs osseuses (Tian et al., 2002) et autour d'implants de hanche lors de synovites induites par les macrophages (Ma et al., 2005) où elle est surexprimée et activée. L'ostéoarthrite ou arthrose se caractérise par une dégénérescence anormale des cartilages qui recouvre les extrémités des os. La recherche de gènes candidats pour prédire la progression de l'ostéoarthrite a mis en évidence une association entre des polymorphismes dans le gène *Adam12* et la progression de la maladie (Kerna et al., 2009; Valdes et al., 2004, 2006).



En relation avec ces observations, l'expression d'ADAM12 est augmentée dans les cartilages ostéoarthritiques comparés aux cartilages sains (Okada et al., 2008). L'expression d'ADAM12 dans les chondrocytes isolés est induite par le TGF $\beta$  qui favorise la prolifération et le clivage d'IGFBP5 par ADAM12 (Okada et al., 2008). En accord avec ces observations, des études ont mis en évidence la corrélation entre le niveau d'expression de la protéine ADAM12S dans les articulations du genou et dans le tissu synovial et la gravité de l'ostéoarthrite (Kerna et al., 2011, 2014).

#### **4.5) Grossesse et pathologies du fœtus**

Les deux formes d'ADAM12 sont largement exprimées dans le placenta (Gilpin et al., 1998). De plus la forme sécrétée d'ADAM12 a été retrouvée dans le sérum de femmes enceintes (Laigaard et al., 2003). Les concentrations sont de 180 $\mu$ g/L à la semaine 8, 670 $\mu$ g/L à la semaine 16 et de 1200 $\mu$ g/L à terme. Par ailleurs, ces concentrations sont significativement plus faibles chez les femmes dont l'enfant est atteint du syndrome de Down (trisomie 21) ou du syndrome d'Edwards (trisomie 18), au cours du premier trimestre (Laigaard et al., 2003, 2005a, 2006). Des essais de seconde génération ont néanmoins remis en question l'utilité pronostique d'ADAM12S bien qu'il puisse être utilisé en combinaison avec d'autres marqueurs afin de diminuer le nombre de faux positifs (Christiansen et al., 2010). ADAM12S est aussi diminuée dans le sérum de femmes qui développent une pré-éclampsie (hypertension artérielle gravidique, cause majeure de mortalité maternelle dans les pays développés) au cours de leur grossesse (Laigaard et al., 2005b). Un faible taux d'ADAM12S dans le sérum est aussi prédictif de fausse couche et de grossesse extra-utérine avant que cela ne soit détectable par échographie (Yang et al., 2014). Enfin, la diminution d'ADAM12S et d'autres marqueurs permet d'identifier les embryons atteints du syndrome transfuseur-transfusé (en anglais : Twin-to-twin transfusion syndrome ou TTTS) avant que les symptômes ne soient visibles (Miura et al., 2014).

Chez la souris, ADAM12 a été décrite comme indispensable à la prolifération des cellules stromales lors de la décidualisation utérine (différenciation des cellules stromales en cellules déciduales) soulignant une implication très précoce au moment de l'implantation du blastocyte (Zhang et al., 2009). Les mécanismes d'action d'ADAM12 dans ce contexte pourraient être associés à la dégradation de l'IGFBP3/5, et donc de l'activation de la voie de l'IGF, qui joue un rôle important dans la croissance fœtale (Forbes and Westwood, 2008).

Par ailleurs, il a été montré qu'ADAM12S favorise la fusion des trophoblastes (couche cellulaire continue formée de fibroblastes qui limite l'œuf, et qui constituera le futur

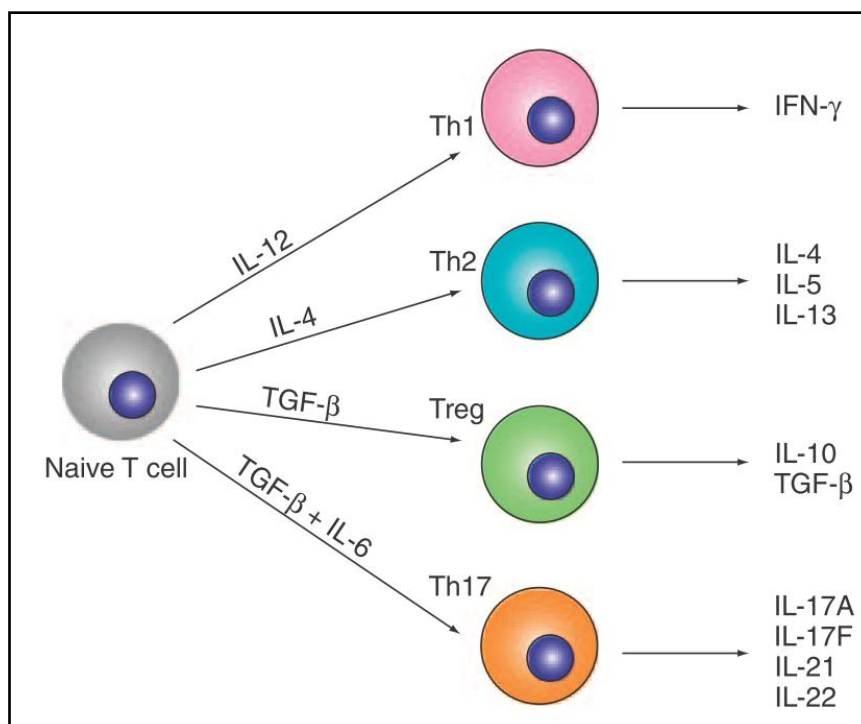
placenta), un processus nécessaire pour assurer les fonctions placentaires, en agissant sur le clivage de la E-cadhérine (Aghababaei et al., 2015). Une autre étude a permis de démontrer un rôle d'ADAM12 dans l'invasion des trophoblastes par un mécanisme impliquant l'étalement des cellules de façon dépendante de l'intégrine  $\beta 1$  (Biadasiewicz et al., 2014). ADAM12 clive aussi P-LAP, une enzyme capable de dégrader l'oxytocine, hormone favorisant le travail et l'accouchement (Ito et al., 2004) soulignant ainsi les multiples implications d'ADAM12, et plus particulièrement ADAM12S, au cours du développement et de la grossesse.

#### 4.6) Désordres neurologiques

La sclérose en plaque est une pathologie neurologique auto-immune caractérisée par une démyélinisation et une inflammation du système nerveux central. L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est un modèle murin très utilisé pour étudier la sclérose en plaque. Un crible des MMPs, des ADAMs, et des TIMPs, a permis d'identifier une surexpression d'ADAM12 au niveau des lymphocytes T dans les souris atteintes d'EAE (Toft-Hansen et al., 2004). L'expression d'ADAM12 a aussi été retrouvée presque exclusivement dans les oligodendrocytes, une localisation très différente des autres ADAMs (Bernstein et al., 2004). Bien que la fonction d'ADAM12 dans ces cellules ne soit pas connue, on peut faire l'hypothèse qu'elle joue un rôle dans la libération des ligands de l'EGFR et de l'IGFR. En effet, les ligands de l'EGFR jouent de nombreux rôles au niveau du système nerveux central et sont exprimés à la fois par les neurones et les oligodendrocytes. De même, l'IGFBP3 est fonctionnellement reliée au développement des oligodendrocytes et à la régénération de la gaine de myéline (Bernstein et al., 2004). Néanmoins, l'expression d'ADAM12 n'est pas cantonnée aux oligodendrocytes. En effet, après induction d'une démyélinisation, la principale source d'ADAM12 dans les régions du cerveau affectées par la perte des oligodendrocytes sont les astocytes (Baertling et al., 2010). Les astrocytes isolés et stimulés par le LPS ou le TNF- $\alpha$  synthétisent ADAM12 de façon NF $\kappa$ B-dépendante. Dans ce contexte, ADAM12 pourrait favoriser la prolifération des astrocytes, ou celle des cellules progénitrices des oligodendrocytes, dans les régions démyélinisées du cerveau.

Les lymphocytes Th17 sont une sous-population de lymphocytes T caractérisés par leur sécrétion d'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans divers maladies auto-immunes dont l'EAE (Komiyama et al., 2006) (**Figure 32**).





**Figure 32 : Les différents sous-types de lymphocytes CD4+.**

*Suite à leur activation par un microenvironnement inflammatoire, les cellules T CD4+ se différencient en cellules Th1, Th2, Th17 ou T régulateur. Le TGFβ et l'IL6 induisent la polarisation (différenciation) Th17, sécrétant en particulier une forte quantité d'IL17 (Schéma de Maniati et al., 2010).*

Zhou et ses collègues ont montré qu'ADAM12 est exprimée à la fois dans les lymphocytes Th17 et les lymphocytes T régulateurs et que cette expression est induite par des cytokines pro-Th17 et le facteur de transcription associé RORγt (Zhou et al., 2013). De façon surprenante, l'inhibition d'ADAM12 en présence de cytokines polarisantes pro-Th17 augmente le nombre de lymphocytes polarisés Th17 ainsi que la sécrétion d'IL17 dans ces cellules. Il est à noter que le blocage du TGFβ par des anticorps bloquant ou l'inhibition de ses voies de signalisation aboutit au même effet reliant ainsi les fonctions du TGFβ et d'ADAM12 dans la régulation des fonctions des cellules Th17. ADAM12 pourrait limiter la production de cytokines pro-inflammatoire par les cellules Th17, ainsi que les effets délétères d'une production excessive de ces cytokines.

ADAM12 a aussi été impliquée dans la maladie d'Alzheimer, une maladie neurodégénérative notamment caractérisée par une accumulation du peptide β-amyloïde dans le milieu extracellulaire. Le peptide β-amyloïde induit la phosphorylation de la protéine Fish, qui régule la localisation d'ADAM12 et entraîne la mort neuronale (Malinin et al., 2005). Cet effet nécessite le domaine métalloprotéase d'ADAM12.

Enfin le gène d'ADAM12 est localisé sur le chromosome 10q26.3, au sein d'un locus de gène lié à la schizophrénie et l'expression d'ADAM12 est fortement diminuée dans les oligodendrocytes des patients atteints de schizophrénie (Farkas et al., 2010). Néanmoins les mécanismes d'action ne sont pas établis.

#### **4.7) Hypertrophie cardiaque**

L'hypertrophie cardiaque se caractérise par une augmentation globale du poids du cœur et d'une hypertension artérielle pouvant conduire à des arrêts cardiaques. Les vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II, la phényléphrine, ou encore l'endothéline-1 sont des inducteurs bien connus de l'hypertrophie cardiaque et leur inhibition est favorable dans le cas d'une perturbation cardiaque (Asakura et al., 2002). Ces vasoconstricteurs agissent par l'intermédiaire de GPCRs qui conduisent à la transactivation de l'EGFR. Nous avons vu précédemment qu'un signal GPCR pouvait permettre la translocation membranaire d'ADAM12 et le clivage du HB-EGF. Dans ce contexte, il a été montré dans un modèle murin d'hypertrophie cardiaque, que l'inhibition d'ADAM12 diminue le shedding du HB-EGF et atténue l'hypertrophie cardiaque (Asakura et al., 2002). Ces résultats ont été validés chez l'humain avec une augmentation de l'expression d'ADAM12 chez les patients atteints de cardiomyopathie obstructive hypertrophique (Fedak et al., 2006). De plus, il a été montré que l'effet médié par ADAM12 nécessite son activation transcriptionnelle par la MMP2, les deux protéines étant contrôlées transcriptionnellement par ADAM17 (Wang et al., 2009a, 2009b).

## **V) ADAM12 dans le cancer**

#### **5.1) ADAM12 est surexprimée dans le cancer**

Au sein de la famille ADAM, ADAM12 est le membre le plus associé aux pathologies cancéreuses. Elle est surexprimée dans un grand nombre de cancers chez l'humain (**Tableau 1** et **Figure 25**) et son expression est corrélée à l'agressivité de la tumeur, notamment dans le cancer du sein.

ADAM12 est majoritairement exprimée par les cellules tumorales, bien que son expression ait été aussi retrouvée dans le stroma de certains cancers. Par exemple, notre laboratoire a montré que ce sont les cellules étoilées activées (stromales) qui sont responsables de l'expression d'ADAM12 dans la fibrose et le cancer du foie. Cependant les cellules tumorales du colon qui métastasent dans le foie expriment ADAM12 (Le Pabic et al., 2003).

	Organe	Type cellulaire	Corrélation	Références
Humain	Mammaire	Cellules tumorales et stromales	Normal vs Cancer vs Cancer Agressif	(Iba et al., 1999)
	Vessie	Cellules tumorales	Normal vs Cancer	(Fröhlich et al., 2006)
	Foie	Cellules stromales	Normal vs Cancer	(Le Pabic et al., 2003)
	Poumon	Cellules tumorales	Normal vs Cancer vs Cancer Agressif	(Rocks et al., 2006)
	Os		Normal vs Cancer	(Tian et al., 2002)
	Estomac		Normal vs Cancer	(Carl-McGrath et al., 2005)
	Colon		Normal vs Cancer	(Iba et al., 1999)
	Cerveau		Normal vs Cancer	(Kodama et al., 2004)
	Nasopharynx		Normal vs Cancer	(Kornberg et al., 2005)
	Prostate		Normal vs Cancer	(Doğru et al., 2014)
	Ovaires		Normal vs Cancer vs Cancer Agressif	(Cheon et al., 2015)
Souris	Mammaire	Cellules tumorales et stromales		(Peduto et al., 2006)
	Prostate			
	Intestin			

**Tableau 1 : ADAM12 est surexprimée dans de nombreux cancers et est associée à un mauvais pronostic.**

*L'expression d'ADAM12 est augmentée dans le cancer (normal vs cancer) et est corrélée au stade de la maladie et au mauvais pronostic des patients (cancer vs cancer agressif). (Tableau adapté de Kveiborg et al., 2008).*

Des études qui distinguent l'expression d'ADAM12L et d'ADAM12S ont permis de mettre en évidence une surexpression des deux variants (Fröhlich et al., 2006; Le Pabic et al., 2003), ou d'ADAM12L uniquement (Iba et al., 1999; Kodama et al., 2004; Rocks et al., 2006). En revanche, aucune étude n'a montré une surexpression du variant ADAM12S uniquement. Ces observations sont surprenantes puisque le seul mécanisme moléculaire qui a été décrit pour modifier l'expression spécifique d'un variant est la dégradation de l'ARNm d'ADAM12L par des miRNA, mécanisme qui ne peut pas expliquer une surexpression d'ADAM12L seulement. Cela suggère qu'il existe d'autres mécanismes favorisant l'expression d'ADAM12L ou bien inhibant l'expression d'ADAM12S.

L'expression différentielle des deux variants a été particulièrement bien étudiée dans les différents sous-types de cancers du sein. Il a ainsi été montré qu'ADAM12L mais pas ADAM12S est surexprimée dans le sous-type claudin-low, le sous-type avec la signature EMT la plus forte, comparé aux autres sous-types (Normal-like, Luminal A/B, HER2-enriched, basal-like) (Li et al., 2013) (**Figure 25**). De façon intéressante, d'autres ADAMs

catalytiquement actives (ADAMs 8, 9, 10, 17, 19, 28, 33) sont aussi surexprimées dans le sous-type claudin-low, mais pas exclusivement.

## **5.2) ADAM12 est fonctionnellement impliquée dans le cancer**

Dans un modèle murin de cancer spontané de la prostate, les souris ADAM12<sup>-/-</sup> présentent une meilleure survie et un volume tumoral plus faible, suggérant un effet promoteur d'ADAM12 dans le cancer (Peduto et al., 2006). Il est à noter que dans ce modèle, ainsi que dans les modèles murins de cancers mammaires et de l'intestin, ADAM12 est retrouvée dans les cellules stromales plutôt que dans les cellules tumorales elles-mêmes. Rappelons par ailleurs que l'effet observé est uniquement dû au variant membranaire ADAM12L, la forme S n'étant pas présente chez la souris.

Le rôle de la forme ADAM12S humaine a été montré dans un modèle murin de xénogreffe de cancer mammaire surexprimant les protéines recombinantes humaines ADAM12S ou un mutant ADAM12L dont la queue cytoplasmique a été délétée. Chacune des deux formes diminue la survie des souris, augmente le volume tumoral ainsi que le taux de métastases (Kveiborg et al., 2005). Cet effet pro-tumoral a été attribué à la capacité d'ADAM12S à protéger les cellules tumorales de l'apoptose, et au contraire, à sensibiliser les cellules stromales à l'apoptose par un mécanisme n'impliquant pas l'activité métalloprotéase d'ADAM12. En accord avec ces observations, il a été proposé que la mort des cellules stromales dans les carcinomes mammaires humains pourrait être un nouveau marqueur de l'invasivité tumorale (Rouleau-Dubois et al., 2004). Plus récemment, la même équipe a montré que l'inhibition d'ADAM12 dans le même modèle murin diminuait le volume tumoral et le nombre de métastases dans les poumons (Fröhlich et al., 2011). Dans ce modèle où ADAM12 est présent à la fois dans le stroma et dans les cellules tumorales, il a été montré que la présence d'ADAM12 dans le stroma n'avait pas d'impact sur la prolifération tumorale. En revanche, les cellules stromales permettent une induction de l'expression d'ADAM12 dans les cellules tumorales, probablement via la sécrétion de TGFβ.

L'impact de chacune des formes a par ailleurs été évalué dans un modèle de xénogreffe en utilisant la lignée mammaire épithéliale MCF7 (luminale B) surexprimant soit le variant ADAM12L, soit le variant ADAM12S, soit le variant sécrété catalytiquement inactif ADAM12S E351Q. Les résultats montrent une augmentation du volume tumoral dans les poumons chez les souris greffées avec les cellules surexprimant ADAM12L et ADAM12S alors que les cellules surexprimant ADAM12S présentent une augmentation pouvoir invasif

(Roy et al., 2011). Le mutant ADAM12S E351Q n'a en revanche aucun effet suggérant que l'effet pro-tumoral médié par ADAM12S est dépendant de son activité métalloprotéase.

### **5.3) Mécanismes d'action**

S'il est clair qu'ADAM12 joue un rôle dans la progression tumorale, les mécanismes moléculaires impliqués restent à être élucidés et en particulier la contribution de chaque isoforme.

#### ***a) Effet sur la prolifération***

L'effet d'ADAM12 sur la prolifération varie selon le modèle et le variant d'ADAM12 utilisé. Ainsi, il a été montré dans des lignées gastriques tumorales (AGS, MKN28, MKN45, NCI-N87) et une lignée de cancer mammaire (MCF7), que des anticorps bloquant anti-ADAM12 augmentent faiblement la prolifération suggérant un rôle inhibiteur de la prolifération (Carl-McGrath et al., 2005; Lendeckel et al., 2004). En revanche, la surexpression des deux isoformes d'ADAM12 confère un avantage prolifératif aux cellules cancéreuses MCF-7 en absence de stimulation par les œstrogènes suggérant que la diminution d'ADAM12 en combinaison avec une thérapie endocrine pourrait augmenter l'efficacité du traitement (Roy and Moses, 2012). Cet effet est médié par une augmentation de l'activation des voies de signalisation des MAPK. D'autre part, la surexpression d'ADAM12 dans des lignées de cancers osseux et pulmonaires induit une augmentation de la prolifération de façon dépendante du clivage de l'HB-EGF (Georges et al., 2013; Rocks et al., 2008).

L'utilisation de cellules MCF7 surexprimant ADAM12L ou ADAM12S dans un modèle murin de xénogreffe a permis de mettre en évidence qu'ADAM12 est capable d'induire une augmentation du volume tumorale sans affecter cependant le taux de prolifération des cellules tumorales (Roy et al., 2011). Cependant, en surexprimant ADAM12S dans le modèle murin de cancer mammaire PyMT, la même équipe a montré qu'ADAM12S et ADAM12S E351Q induisaient une augmentation de la prolifération (Fröhlich et al., 2011).

Malgré un effet clair d'ADAM12 sur la croissance tumorale, son action sur la prolifération est plus ambiguë et dépend du modèle utilisé. ADAM12L pourrait n'avoir aucun effet prolifératif dans les cellules différenciées comme les MCF7.

#### ***b) Effet sur l'apoptose***

En plus de son effet sur la prolifération tumorale, il a été montré qu'ADAM12 pouvait moduler la résistance à l'apoptose. En effet, les cellules tumorales surexprimant ADAM12S

présentent une résistance accrue à l'apoptose (Kveiborg et al., 2005; Roy et al., 2011), tandis que son expression dans les cellules stromales induit une sensibilité à l'apoptose, qui ne dépend pas de l'activité métalloprotéase d'ADAM12S, du moins *in vitro* (Kveiborg et al., 2005). D'autres études ont montré une implication d'ADAM12L dans la protection contre l'apoptose. Ainsi, la surexpression d'ADAM12L dans des cellules épithéliales bronchiques normales induit une protection des cellules contre la mort induite par l'etoposide, par un mécanisme impliquant le clivage de l'HB-EGF (Rocks et al., 2008). De même, la surexpression d'ADAM12L dans des cellules MCF7 réduit leur apoptose dans des gels 3D de collagène, cette fois, par un mécanisme n'impliquant ni son activité métalloprotéase ni son domaine cytoplasmique (Albrechtsen et al., 2013).

### *c) Effet sur la migration et l'invasion*

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression d'ADAM12 est corrélée à des phénotypes tumoraux plus agressifs. L'utilisation de modèles murins a permis de montrer un rôle d'ADAM12 à la fois dans la croissance tumorale mais aussi dans la formation des métastases, suggérant donc un rôle pro-migratoire et/ou pro-invasif d'ADAM12. La surexpression d'ADAM12S mais pas d'ADAM12L dans les cellules MCF7 augmente leurs capacités de migration et d'invasion en formant plus de métastases que les cellules MCF7 contrôles (Roy et al., 2011). D'autres études ont néanmoins mis en évidence un effet pro-migratoire et pro-invasif des deux variants d'ADAM12 dans des modèles de cancer de la tête, du cou et de la peau (Rao et al., 2012, 2014). De même, il a été montré dans les cellules de tumeurs mammaires MCF10DCIS.com, qu'ADAM12L favorise la formation de sphères, synonyme d'une bonne capacité d'invasion (Li et al., 2013). Ainsi, il semble que les propriétés pro-invasives d'ADAM12S et d'ADAM12L soient liées au modèle cellulaire. En particulier, ADAM12L a un effet pro-invasif dans les cellules MCF10DCIS.com, un modèle partiellement épithélial mais pas dans les cellules épithéliales MCF7. Comme pour l'effet sur la prolifération, l'action pro-invasive d'ADAM12L pourrait n'être possible que pour des cellules dans un état partiellement mésenchymateux.

Très récemment, l'ephrine A1 a été montrée pour être clivée par ADAM12L en réponse au TGF $\beta$  (Ieguchi et al., 2013). L'ephrine A1 ainsi libérée pourrait favoriser la présence de métastases au niveau des poumons en augmentant la perméabilité de l'endothélium. Ainsi, ADAM12L pourrait favoriser indirectement la formation des métastases en régulant le microenvironnement endothélial. De même, ADAM12L est capable de cliver plusieurs

molécules d'adhésion endothéliales comme la VE-cadhérine, suggérant un rôle dans la néovascularisation et l'extravasation des cellules tumorales (Fröhlich et al., 2013).

#### *d) Effet sur la chimiorésistance*

L'implication potentielle d'ADAM12L dans la chimiorésistance est argumentée notamment par la surexpression d'ADAM12L dans le sous-type claudin-low des cancers mammaires, qui présente une forte résistance aux chimiothérapies (Li et al., 2013). De même, le traitement de cancers mammaires par une thérapie endocrine montre un enrichissement de l'expression d'ADAM12L alors que son expression diminue chez les patients présentant une rémission complète.

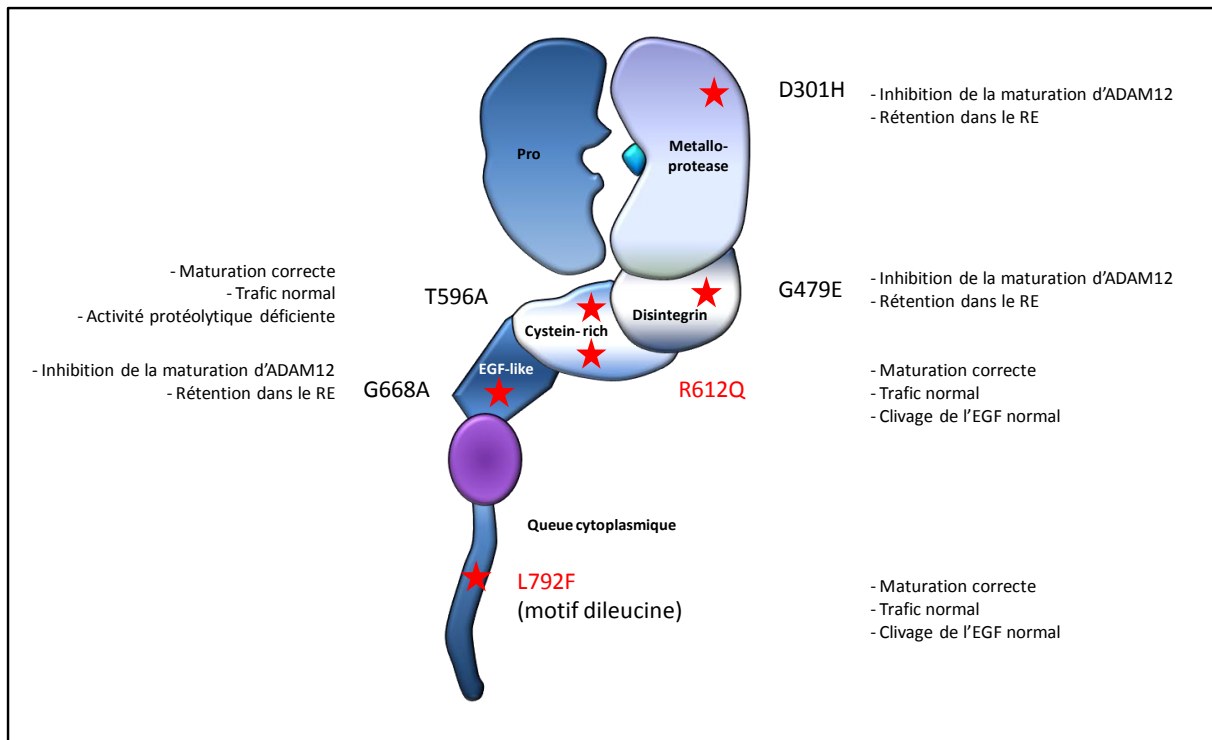
#### **4.4) ADAM12S comme marqueur pronostique**

La forme sécrétée ADAM12S est excrétée dans les urines et constitue un marqueur efficace et surtout non invasif de la progression tumorale. Ainsi, des taux élevés d'ADAM12S dans les urines de patientes présentant un cancer du sein sont associés à la gravité de la maladie (Roy et al., 2004). Les quantités d'ADAM12S dans les urines sont aussi associées au cancer de la vessie, ce taux diminuant après résection de la tumeur et augmentant dans les cas de récurrence (Fröhlich et al., 2006). La présence d'ADAM12 comme marqueur pronostique du cancer de la vessie a été brevetée par l'équipe d'Ulla Wewer en 2009. Plus tard, la présence d'ADAM12S dans les urines a été associée à l'agressivité des cancers de l'ovaire (Cheon et al., 2015), de l'intestin (Shimura et al., 2015) et de la prostate (Doğru et al., 2014).

#### **5.5) Mutations d'ADAM12 dans le cancer**

Six mutations non-sens ont été identifiées dans le cancer du sein pour ADAM12 (Sept 2013, COSMIC database - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>). Comparé aux autres protéines catalytiquement actives des ADAMs, le nombre de mutations dans le gène codant pour ADAM12 est relativement élevé, ce qui peut être expliqué par sa localisation au niveau du chromosome 10q26.2, une région formant des structures secondaires sensibles aux mutations (Dillon et al., 2013). La localisation des différentes mutations est schématisée dans la **Figure 33**.





**Figure 33 : Mutations d'ADAM12 retrouvées dans le cancer du sein.**

Sur les 6 mutations, 4 inhibent les fonctions d'ADAM12. Les mutations D301H (équivalent D299H chez la souris), G479E (équivalent G477E chez la souris) et G668A empêchent la maturation de la protéine en la séquestrant dans le réticulum endoplasmique (Dyczynska et al., 2008; Qi et al., 2014). La mutation T596A dans le domaine riche en cystéine permet le trafic normal de la protéine jusqu'à la membrane mais perd son activité métalloprotéase, suggérant que le prodomaine et le domaine métalloprotéase ne sont pas les seuls domaines affectant l'activité catalytique (Qi et al., 2014). Aucune différence de maturation, de trafic ou de protéolyse n'a été identifiée pour les mutations de la queue cytoplasmique L792F et du domaine EGF-like R612Q (Qi et al., 2014; Stautz et al., 2012b). Il est à noter que l'ensemble de ces observations a été montré par des études de surexpression, qui ne prennent pas en compte la régulation physiologique complexe d'ADAM12. De façon intéressante, les formes portant les deux mutations qui ne modifient pas la fonction d'ADAM12 sont exprimées dans les cancer triple négatifs, alors que les formes possédant les mutations pertes de fonction ne sont pas exprimées dans les TNBC, confortant le rôle d'ADAM12 dans ce type de cancer (Qi et al., 2014).



# OBJECTIFS DE THESE

---

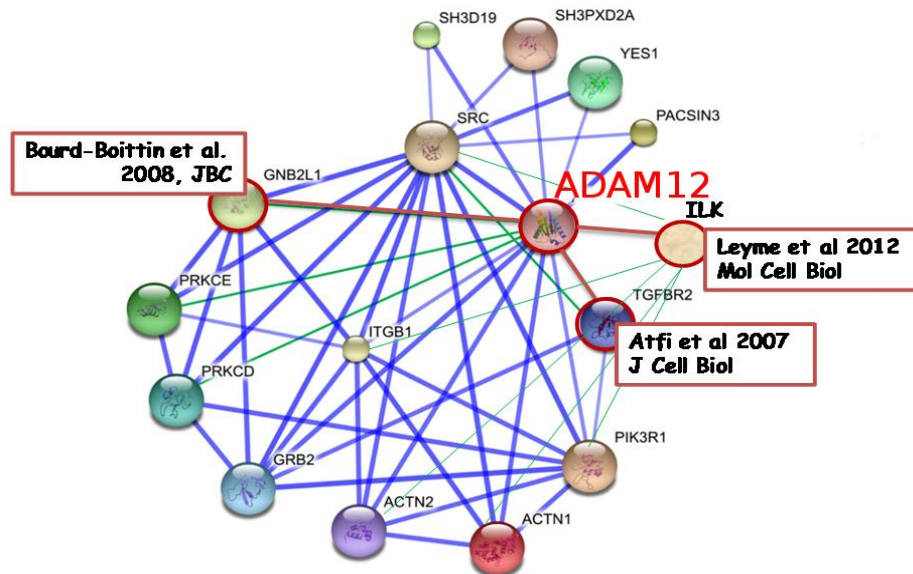
## **Rôle d'ADAM12 dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse**

Les échanges entre les cellules tumorales et le microenvironnement jouent un rôle essentiel dans le développement des tumeurs. Dans ce contexte, la nouvelle famille de métalloprotéases, les Adamalysines (ADAM/ADAMTS) constituent aujourd'hui des régulateurs majeurs de la progression tumorale en agissant sur la biodisponibilité des médiateurs de la communication cellulaire que sont les cytokines, chimiokines et facteurs de croissance (Duffy et al., 2009; Kessenbrock et al., 2010). L'échec des thérapies ciblant les activités des autres métalloprotéases et la mise en évidence de la diversité des mécanismes impliquant les Adamalysines font apparaître celles-ci comme de nouvelles cibles thérapeutiques.

Parmi les Adamalysines, la protéine ADAM12 se distingue par ses multiples implications. Elle peut être synthétisée à la fois par les cellules tumorales et les cellules stromales et ses capacités d'adhésion et de protéolyse, deux fonctions jouant un rôle majeur dans le développement des cancers, font d'elle une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt (Jacobsen and Wewer, 2009; Kveiborg et al., 2008). Le gène humain code pour une forme transmembranaire ADAM12L et une forme sécrétée courte issue d'un épissage alternatif, ADAM12S, qui sont toutes deux surexprimées dans le cancer. ADAM12S aurait un rôle dépendant de son activité catalytique et associé à l'invasivité tardive des cellules tumorales alors que la forme longue agirait indépendamment de son activité protéolytique dans les stades précoces (Fröhlich et al., 2011; Roy et al., 2011). Le rôle direct dans la transduction du signal est porté par les interactions du domaine cytoplasmique d'ADAM12L avec différents acteurs de la signalisation tels que c-SRC, p85 $\alpha$ PI3K, FISH, EVE-1, PACSIN3 et des composants du cytosquelette comme l' $\alpha$ -actinine. Les ADAMs sont caractérisées par des domaines spécifiques ; un prodomaine, un domaine métalloprotéase, disintégrine, riche en cystéine, transmembranaire et cytoplasmique. Les domaines disintégrine et riche en cystéine d'ADAM12 sont responsables de son interaction avec les intégrines et les syndécans de surface modulant les signaux cellules-cellules et cellules-matrice. Par conséquent ADAM12 se situe au cœur d'un réseau d'interactions protéiques clairement associé à la signalisation cellulaire.

Au cours de ces dernières années, notre équipe a :

- mis en évidence l'association de la protéine ADAM12 avec la progression tumorale du carcinome hépatocellulaire (Le Pabic et al., 2003, 2005).
- montré son rôle dans la régulation de l'activité du facteur de croissance TGF $\beta$  (Atfi et al., 2007; Gruel et al., 2009).
- caractérisé son implication dans la signalisation dépendante des intégrines et la survie cellulaire (Bourd-Boittin et al., 2008; Leyme et al., 2012).



**Figure 34 : Réseau d'interaction des 14 protéines partenaires d'ADAM12L d'après la base de données STRING.**

*Les interactions non présentes dans la base de données ont été ajoutées en vert. Les trois protéines identifiées par l'équipe sont surlignées en rouge.*

La reconstruction *in silico* du réseau d'interaction protéique suggère un rôle clé d'ADAM12 dans l'altération de la signalisation du TGF $\beta$  associée à la transition épithélio-mésenchymateuse et l'invasion métastatique. En effet, ADAM12 a été largement décrite comme une protéine impliquée dans la différenciation des cellules mésenchymateuses. Son expression est régulée par le TGF $\beta$  qui lui-même régule ces processus de différenciation. Cependant, l'expression d'ADAM12 a été identifiée dans de nombreuses cellules et lignées tumorales d'origine épithéliale humaine suggérant une réexpression au cours de la dédifférenciation des cellules tumorales (Kveiborg et al., 2008). Compte tenu de ces observations et des travaux de notre équipe, nous avons émis l'hypothèse d'un rôle d'ADAM12 dans l'EMT.

ADAM12 pourrait contribuer à cette transition en modulant les voies de signalisation du TGF $\beta$  d'un profil canonique, dépendant des protéines SMAD à des voies dites "non SMAD"

qui sont fortement induites dans le cancer comme la voie PI3K/AKT (Zhang, 2009). En effet, la signalisation du TGF $\beta$  passe par la fixation à un récepteur à thréonine kinase, T $\beta$ RII qui recrute le T $\beta$ RI et conduit à la phosphorylation des protéines SMAD qui vont réguler la transcription des gènes cibles. Il existe d'autres voies de signalisation dépendantes des récepteurs au TGF $\beta$  (Bierie and Moses, 2006). Les voies non SMAD dépendent aussi du récepteur de type II mais activent les systèmes MAP kinase, Rho-likeGTPases, et phosphatidylinositol-3-kinase/AKT. En accord avec cette hypothèse, notre équipe vient de montrer qu'ADAM12L interagit avec ILK (Leyme et al., 2012), décrite comme un intermédiaire de signalisation dans l'EMT (Li et al., 2003) et ce nouveau complexe ILK/ADAM12 est associé à l'activation de la voie PI3K/AKT. De plus, parmi les interagissant connus d'ADAM12L, les protéines ITGB1, PIK3R1, et GRB2 sont indispensables à l'EMT induite par le TGF $\beta$  (Bakin et al., 2000b; Bhowmick et al., 2001b; Galliher-Beckley and Schiemann, 2008) et la protéine Src est nécessaire pour phosphoryler le récepteur de type II au TGF $\beta$  activant ainsi la voie p38MAPK lors de l'EMT (Galliher and Schiemann, 2006). L'ensemble de ces observations souligne le lien entre les réseaux de signalisation ADAM12 et TGF $\beta$ , potentiels nouveaux partenaires lors de la progression tumorale conduisant à l'EMT.

**Mes objectifs de thèse visent à évaluer le rôle éventuel d'ADAM12 dans la transition épithélio-mésenchymateuse.**

Pour cela, nous avons dans un premier temps analysé l'association de son expression avec les marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuses dans un panel de lignées de cancer du sein et dans des biopsies de patientes présentant une tumeur mammaire. Nous avons ensuite étudié l'effet de la surexpression et d'une inhibition d'ADAM12 dans le modèle de cellules épithéliales mammaires non tumorales MCF10A connu pour subir l'EMT lors d'un traitement au TGF $\beta$ . Enfin, nous avons caractérisé les mécanismes sous-jacents, en particulier déterminé les domaines d'ADAM12 impliqués dans l'EMT et analysé les effets d'ADAM12 en relation avec les voies de signalisation du TGF $\beta$  impliquées dans l'EMT.

Ce travail a fait l'objet d'une publication présentée dans la première partie "Résultats". En complément de ce travail, nous avons réalisé un certain nombre d'expérimentations qui sont présentées sous forme de "Résultats complémentaires".

## RESULTATS

---



# RESULTATS

---

L'article "**The disintegrin and metalloprotease ADAM12 is associated with TGF $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition**" a été accepté pour publication au journal **Plos One** le 15 septembre 2015.

**Contexte :** L'expression d'ADAM12 a été largement décrite pour être augmentée dans plusieurs types de cancers, néanmoins les mécanismes moléculaires impliqués restent à démontrer. Nous avons précédemment décrit que l'expression d'ADAM12 est induite par le TGF $\beta$  et qu'ADAM12 induit l'activation de voies de signalisation associées au TGF $\beta$  via une interaction avec le récepteur de type II au TGF $\beta$ . Dans ce contexte, nous avons recherché le rôle d'ADAM12 dans la transition épithélio-mésenchymateuse, un processus majeur impliqué dans la progression tumorale et dont le principal inducteur est le TGF $\beta$ .

**Résultats :** Nos résultats montrent une corrélation de l'expression d'ADAM12L et d'ADAM12S avec les marqueurs mésenchymateux Vimentine et N-cadhérine et une corrélation inverse avec le marqueur épithéliale E-cadhérine dans une large cohorte de tumeurs mammaires et dans des lignées de cancer mammaires. Dans le modèle de cellules épithéliales mammaires non tumorales MCF10A, l'expression d'ADAM12L est induite au cours de l'EMT induite par le TGF $\beta$ . La surexpression d'ADAM12L dans les MCF10A induit spontanément un phénotype mésenchymateux caractérisé par une baisse de la E-cadhérine et une augmentation de la Vimentine. Cet effet est médié par la queue cytoplasmique et non par l'activité métalloprotéase puisque la forme mutée sur le domaine métalloprotéase est toujours capable d'induire l'EMT contrairement à ADAM12S ou à une protéine ADAM12L délétée pour sa queue cytoplasmique. L'induction du phénotype mésenchymateux par la surexpression d'ADAM12L dans les MCF10A est associée à une résistance à l'apoptose, caractérisée par une résistance au cisplatine et au FasL, et une baisse de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, la surexpression d'ADAM12L augmente le niveau basal d'activation des voies de signalisation associées au TGF $\beta$  : SMAD3, AKT et ERK. La voie de signalisation ERK et le récepteur de type I au TGF $\beta$  sont particulièrement importants pour l'EMT induite par la surexpression d'ADAM12L puisque l'inhibition de ERK ou de T $\beta$ RI permet la réversion partielle du phénotype. La stimulation des cellules MCF10A surexprimant ADAM12L augmente l'EMT induite par le TGF $\beta$  comparé aux cellules contrôles suggérant une action synergique d'ADAM12L et du TGF $\beta$ .

**Conclusion :** L'ensemble de ces résultats montre un rôle pour la forme membranaire d'ADAM12 dans l'EMT via la stimulation de voies de signalisations associées au TGF $\beta$ .





**The disintegrin and metalloprotease ADAM12 is associated with TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition**

**Short title: ADAM12 and TGF- $\beta$ -induced EMT**

Michaël Ruff<sup>1</sup>, Anthony Leyme<sup>1,#</sup>, Fabienne Le Cann<sup>1</sup>, Dominique Bonnier<sup>1</sup>, Jacques Le Seyec<sup>1</sup>, Franck Chesnel<sup>2</sup>, Laurent Fattet<sup>3</sup>, Ruth Rimokh<sup>3</sup>, Georges Baffet<sup>1</sup>, Nathalie Thérét<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U1085, IRSET, Université de Rennes 1, Rennes, France

<sup>2</sup> CNRS UMR6290 IGDR, Université de Rennes, France

<sup>3</sup>INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

<sup>#</sup> Current Address: Boston University School of Medicine, Department of Biochemistry, Boston MA 02118

\* Corresponding author

E-mail: [nathalie.theret@univ-rennes1.fr](mailto:nathalie.theret@univ-rennes1.fr)

## Abstract

The increased expression of the Disintegrin and Metalloprotease ADAM12 has been associated with human cancers, however its role remain unclear. We have previously reported that ADAM12 expression is induced by the transforming growth factor, TGF- $\beta$  and promotes TGF- $\beta$ -dependent signaling through interaction with the type II receptor of TGF- $\beta$ . Here we explore the implication of ADAM12 in TGF- $\beta$ -mediated epithelial to mesenchymal transition (EMT), a key process in cancer progression. We show that ADAM12 expression is correlated with EMT markers in human breast cancer cell lines and biopsies. Using a non-malignant breast epithelial cell line (MCF10A), we demonstrate that TGF- $\beta$ -induced EMT increases expression of the membrane-anchored ADAM12L long form. Importantly, ADAM12L overexpression in MCF10A is sufficient to induce loss of cell-cell contact, reorganization of actin cytoskeleton, up-regulation of EMT markers and chemoresistance. These effects are independent of the proteolytic activity but require the cytoplasmic tail and are specific of ADAM12L since overexpression of ADAM12S failed to induce similar changes. We further demonstrate that ADAM12L-dependent EMT is associated with increased phosphorylation of Smad3, Akt and ERK proteins. Conversely, inhibition of TGF- $\beta$  receptors or ERK activities reverses ADAM12L-induced mesenchymal phenotype. Together our data demonstrate that ADAM12L is associated with EMT and contributes to TGF- $\beta$ -dependent EMT by favoring both Smad-dependent and Smad-independent pathways.

## Introduction

ADAM12 is a member of the ADAM (a metalloprotease and disintegrin) protein family, a class of cell surface glycoproteins whose functions have been implicated with cell adhesion, migration, proteolysis and signaling [1]. During the last decade, ADAM12 emerged as the most strongly functional ADAM in human tumor development. Up-regulation of ADAM12 has been described in numerous cancers, including breast [2–5], colon [2], hepatocellular carcinomas [6], glioblastomas [7], stomach [2,8], oral cavity [9], bladder [10], lung [11,12] and giant cell tumors of bone [13]. ADAM12 has been shown to regulate tumor progression in mouse models either by increasing tumor cell resistance to apoptosis [3], by providing stromal support [14] or by inducing cell proliferation [15]. In addition genome-wide analyses of human breast and colorectal cancers identified ADAM12 as a new candidate cancer gene [16]. As a whole, ADAM12 is now considered as a negative prognosis marker for human bladder [10,17] and breast cancers [18,19] and is suggested to be an important player in tumor-stromal crosstalk that supports tumor progression [20].

At the molecular level, human ADAM12 exists as two alternatively splicing forms. The long transmembrane form (ADAM12L) is composed of pro-, metalloprotease, disintegrin, cysteine-rich, and transmembrane domains and a cytoplasmic tail. The short secreted form (ADAM12S) lacks the C-terminal transmembrane and cytoplasmic domains. Recent finding enlightened the differential role of the long and short forms of ADAM12 leading to the hypothesis that ADAM12L might be involved in the early-stage of breast cancer and ADAM12S might be rather implicated in the migration and invasion of cancer cell [15]. While the role of ADAM12S in cancer has been associated with its proteolytic activity, ADAM12L has been demonstrated to exhibit oncogenic properties through protease-dependent and -independent activities [21]. ADAM12L interacts with 14 proteins involved in signaling pathways and we recently demonstrated that they form together a highly connected protein network [22].

Importantly, most of these components are implicated in TGF- $\beta$  signaling pathways which play a pivotal role in epithelial-mesenchymal transition (EMT), cell proliferation and metastasis [23]. TGF- $\beta$  signals through a heteromeric complex of two types of transmembrane serine/threonine

kinases, the type I (T $\beta$ RI) and type II (T $\beta$ RII) receptors. TGF- $\beta$  binding to T $\beta$ RII induces the recruitment and phosphorylation of T $\beta$ RI which transduces signals to downstream intracellular substrates, the Smad proteins. Alternatively, non-canonical Smad pathways initiated by TGF- $\beta$  receptors include Ras/MAP-kinase pathway, Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAP-kinase pathways, Rho-like GTPase signaling pathways, and phosphatidylinositol-3-kinase/AKT pathway. We have previously identified ADAM12 as an interacting partner of T $\beta$ RII which increases phosphorylation of the signaling Smad proteins and up-regulates TGF- $\beta$  transcriptional activity and receptor trafficking [24,25]. We have also identified two other ADAM12-binding proteins that include RACK1 [26] a receptor for protein kinase C and partner of Smad3 [27] and the integrin linked kinase ILK [22] a key player in TGF- $\beta$ -dependent EMT [28]. Additionally, ADAM12 has been shown to bind beta 1 integrin (ITGB1), the regulatory subunit of phosphoinositide-3-kinase p85 $\alpha$  (PI3KR1), the adaptor protein Grb2 and the protein kinase C PKC- $\delta$  [21] which have been involved in TGF- $\beta$ -dependent EMT [29]. Similarly, ADAM12 interacts with the proto-oncogene Src [30] and beta 3 integrin ITGB3 [31] which are required for T $\beta$ RII phosphorylation and EMT [32].

In this study we investigated the functional association of ADAM12 with TGF- $\beta$ -dependent EMT in cancer. We show that ADAM12 expression is correlated with expression of EMT markers in human breast tumor samples and breast cancer cell lines. Using the non-malignant breast epithelial cell line MCF10A, we demonstrate that TGF- $\beta$  treatment induces ADAM12L expression during the course of TGF- $\beta$ -dependent EMT. Importantly forced expression of ADAM12L in MCF10A cells induces loss of polarity, reorganization of actin cytoskeleton, up-regulation of EMT markers and chemoresistance. These effects are independent of its proteolytic activity and are associated with the activation of ERK-dependent pathways.

## **Material and Methods**

### **Tissue samples.**

Human tissue samples were obtained from the Biological Resource Center of Centre Léon Bérard (<http://www.centreleonberard.fr/>) after approval by the Comité de Protection des Personnes Lyon-Est and by the institutional review board and ethics committee of Centre Léon Bérard (French agreement number: DC-2008-99). Patient gave written informed consent after acquisition of information from the physicians. Tissue specimens were collected before any therapy from 89 patients suffering from breast cancer diagnosed between 1993 and 2001. The mean patient age at surgery was 51 + 11 years (range, 27–83 years). The mean size of tumors was 3.9 + 3.1 cm and forty-four percent of the patients showed metastasis at the time of diagnosis.

### **Cell culture and treatment**

The human breast cancer cell lines (S1 Table) were generously provided by Dr. R. Rimokh (CRCL, Lyon) and grown in different cell culture media as described [33]. The mammary epithelial cell line MCF10A was obtained from American Type Culture Collection and MCF10A cells infected with LXS-N-K-RasV12 or an empty vector [34] were provided by Dr BH Park (Baltimore, MD, USA). Primary human mammary epithelial cells (HMEC) infected with a retrovirus carrying hTERT, H-Ras-V12 Ras and SV40 large T antigen were provided by Dr RA Weinberg (Cambridge, MA, USA) [35]. HMECs immortalized by hTERT and Ras were designated HMEC-TR. HMECs immortalized by SV40 large T, hTERT and Ras were designated HMEC-LTR. The human mammary epithelial cells (MCF10A) were cultured in (1:1) DMEM:F12 medium supplemented with 5% horse serum, 100 ng/ml cholera toxin, 20 ng/ml EGF, 500 ng/ml hydrocortisone, and 10 µg/ml insulin. Epithelial mesenchymal cell transition was induced by treatment with recombinant TGF-β1 (Peprotech, France) at 5 ng/ml. The expression vectors for GFP-ADAM12L, ADAM12S and the protease inactive mutant ADAM12L-E351Q, were a gift from Dr. U. Wewer (Biotech Research & Innovation Centre (BRIC), University of Copenhagen). To generate lentiviral constructs, full length GFP-ADAM12L was subcloned into the pLVX-Puro vector (Clontech) and ADAM12L-E351Q and ADAM12S were subcloned into the pLVX-AcGFP1-N1 vector (Clontech).

To produce viral particles, HEK293T cells were transfected with lentiviral constructs and the packaging vectors pMD2.G and psPAX2 using calcium phosphate transfection. At 48 hours after transfection, supernatant containing lentiviruses were collected and centrifugated at 130000g for 2h at 4°C on a 20% sucrose cushion to concentrate viruses. MCF10A cells were incubated with lentiviral particles for 48h and next selected and maintained in medium supplemented with 2µg/ml puromycin. Cytofluorimetric methods were used to enrich in positive cells before all experiments. For ADAM12 knockdown, MCF10A cells were incubated with GIPZ Lentiviral shADAM12 Transduction Particles (VGH5518 from Fisher Scientific, France) or with non-targeting shRNA control particles according to the manufacturer's instructions. When indicated, cells were treated with TβR1inhibitor, SB431542 (10µM), ERK/MEK inhibitor U0126 (10 µM) and PI3K inhibitor, Wortmannin (10 µM).

## Relative quantification of mRNA

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using the fluorescent dye SYBR Green methodology with the Sybr™ Green I qPCRTM Core Kit (Eurogentec, Seraing, Belgium) and the ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer, Foster city, CA, USA). The sequences of primer pairs are described in Table 1.

**Table 1:** List of oligonucleotide primer pairs used in real time RT-PCR

Name	Sense	Anti-sense
<b>ADAM12L</b>	CAC CAT TGA AAA ACT AAG GTG TGT	GAG CCT GAC AGG GTT GGA AG
<b>ADAM12S</b>	CTG GGC ACC TCC CTT CTG	TGC TTC TGC TTG CCG GA
<b>Vimentin</b>	CCA AAC TTT TCC TCC CTG AAC C	GTG ATG CTG AGA AGT TTC GTT GA
<b>N-cadherin</b>	GTG CAT GAA GGA CAG CCT	ATG CCA TCT TCA TCC ACC TT
<b>E-cadherin</b>	GTC ATC CAA CGG GAA TGC A	TGA TCG GTT ACC GTG ATC AAA A
<b>TGF-β</b>	TGC GCT TGA GAT CTT CAA ACA	GGG CTA GTC GCA CAG ACC TC
<b>Twist</b>	GCA AGA TTC AGA CCC TCA AGC	CTC CAT CCT CCA GAC CGA GA
<b>Fibronectin</b>	GAA GAG CGA GCC CCT GAT	GGG GTC TTT TGA ACT GTG GA

<b>β-catenin</b>	AAA ATG GCA GTG CGT TTA G	TTT GAA GGC AGT CTG TCG TA
<b>18S</b>	CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC	TTG GCA AAT GCT TTC GCT C

152

## 153 **Western blotting**

154 Cells lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to  
155 nitrocellulose membranes (GE Healthcare, UK). The membranes were incubated for 1 hour in Tris-  
156 buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dry milk and incubated overnight with  
157 primary antibodies. The bound antibodies were visualized using horseradish peroxidase-conjugated  
158 antibodies against rabbit or mouse IgGs (DAKO, Les Ulis, France) using an enhanced  
159 chemiluminescence system (Millipore, Billerica, MA, USA). Antibodies were; ADAM12  
160 polyclonal antibody from Sigma-Aldrich. Anti-α-phospho-p38 (Thr180/Tyr182), anti-p38 MAPK,  
161 anti-Smad2 (86F7); anti-phospho-Smad2 (Ser465/467), anti-Smad3, anti-phospho-Smad3  
162 (Ser423/425), anti-phospho-Akt (Ser473) (D9E), anti-Akt (C67E7), anti-phospho-ERK1/2  
163 (T202/Y204) (E10), anti-ERK1/2 (137F5), anti-phospho-JNK (Thr183/Thr185) (G9), E-cadherin  
164 (24E10), N-cadherin, anti-cleaved caspase 3 (Asp175) (5A1E) and anti-Bid were from Cell  
165 Signaling (Saint Quentin en Yvelines, France). Anti-actin and anti-JNK were from Santa Cruz  
166 Biotechnology (CA, USA). Anti-vimentin (V9) was from Dako. ADAM12 enrichment from  
167 MCF10A cell lysates was performed using affinity chromatography on a HiTrap Con A column.  
168 Briefly protein extracts were homogenized in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM  
169 NaCl, 0.05% Chaps). After several washes with the binding buffer, proteins were eluted with 20  
170 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 0.2% Chaps and 0.5 M methyl α-D-mannopyranoside.  
171 Densitometry analyses were performed with ImageJ software.

172

## 173 **Immunostaining and imaging**

174 To detect actin, E-cadherin and vimentin in MCF10A, cells were fixed with 4% paraformaldehyde  
175 for 15min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS before incubation with rabbit E-  
176 cadherin antibody (Cell Signaling) followed by alexa 555-conjugated anti-rabbit (Cell Signaling),  
177 vimentin antibody (Dako) followed by alexa 555-conjugated anti-mouse (Cell Signaling) or



rhodamine-phalloidin (Interchim, Montluçon, France). The slides were washed, mounted and viewed using an automated LEICA DMRXA2 microscope.

## **Cell Proliferation**

MTT assay was used to measure cell proliferation and survival. Briefly, cell numbers were investigated by incubating cells with MTT for 2 h. The resultant formazan was dissolved in DMSO, and absorbance was measured at 550 nm on Spectramax microplate reader (Molecular Devices, Wokingham, UK).

## **Migration assay**

For Wound Healing assays, the confluent monolayer was scratched using a pipette tip and incubated with 2.5 µg/ml mitomycin without serum and images were captured using an automated LEICA DMRXA2 microscope at the indicated times. For Boyden chambers assays (Millipore, Molsheim, France), epithelial cells ( $3 \times 10^5$  cells per chamber) were added to the top chamber in low serum (1%)-containing medium. The bottom chamber was filled with low serum (1%)-containing medium. Cells were cultured for 24 h at 37 °C. To quantify migration, cells were mechanically removed from the top side of the membrane using a cotton-tipped swab, and migrating cells from the reverse side were fixed with methanol and stained with Giemsa. For each experiment, five representative pictures were taken for each insert, then cells were lysed and absorbance at 560 nm correlated to the amount of Giemsa stain was measured.

## **Soft agarose colony formation assay**

Anchorage-independent cell growth was determined by analyzing colony formation of cells in soft agar. Cells ( $1 \times 10^4$ ) were resuspended in 1 ml of top agar (MCF10A media containing 0.35% Noble agar (USB Corp., Cleveland, OH) warmed to 40 °C). The cell suspension was layered onto 1 ml of set bottom agar (MCF10A media containing 0.5% Noble agar) in a 6-well plate. One milliliter of medium was added on the top agar and changed once per week to compensate for evaporation. Colonies greater than 100 cells were scored after 4 weeks.

## **Viability assay**

For cytotoxicity assays, cells ( $2.5 \times 10^4$ ) were seeded in 96-well plates. Cells were treated with cisplatin or FasL for the indicated time and cell viability was determined by the MTT assay. Absorbance was measured at 550nm on Spectramax microplate reader (Molecular Devices, Wokingham, UK), and percentage of viability was calculated as the absorbance ratio of treated to untreated cells.

## **Caspase-3/7 activity**

For cisplatin and FasL-induced toxicity experiments, caspase-3/7 activity was measured using „Sensolyte Homogeneous AMC Caspase-3/7 Assay“ kit (Anaspec, Le-Perray-en-Yvelines, France) following manufacturer’s instructions. Briefly, cells were incubated with the caspases-3/7 substrate Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin (DEVD-AMC) for 1h at 37°C and cleavage of the substrate AMC by caspases was measured by spectrofluorometry (Molecular Devices) at 380/440nm (ex/em). Results were expressed as Vmax.

## **Bioinformatic tool and database**

Gene array data were extracted from the genomics data repository, Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Text mining analysis was performed using CoPub tool (<http://services.nbic.nl/copub5>).

## Results

### **ADAM12 is associated with the expression of mesenchymal markers in breast cancer cell lines and human breast tumors.**

To evaluate the putative implication of ADAM12 in EMT, we first performed *in silico* analyses using transcriptional data previously reported for breast cancer cell lines [36,37]. Cell lines have been shown to cluster into basal-like and luminal expression subsets and the basal-like cell lines resolved into two distinctive clusters, Basal A and Basal B. [38]. Because Basal B cells have a mesenchymal-like appearance while Basal A cells exhibit luminal-like morphology, we searched for genes differentially expressed between Basal B cell lines and the more differentiated Luminal and Basal A cell lines. For that purpose, microarray data were extracted from Gene Expression Omnibus (GEO) database repository and we performed new analyses using SAM (Significance Analysis of Microarrays) tool. As detailed in S2 Table, we identified 665 genes overexpressed in Basal B cells including ADAM12 and EMT-associated genes such as CDH2, SNAI2 and VIM. To further characterize the relationships between these genes, we performed a text mining analysis of the 100 most statistically significant genes to build clusters of co-cited genes. As shown in Fig. 1A, ADAM12 is linked with several members of TGF- $\beta$  signaling such as TGFB1 itself, the receptor TGFBR2 and the antagonizing protein FSTL3 but also with the metalloproteases MMP2 and ADAM19, the N-cadherin (CDH2), the fibroblast activation protein FAP, the actin regulatory protein CAPG and a member of the hyaluronan-binding protein family, TNFAIP6.

To confirm these data, we performed new RT-PCR experiments on an independent set of 20 breast cancer cell lines. We observed again a strong correlation between expression of ADAM12L and ADAM12S with expression of N-cadherin ( $R=0.75$  and  $R=0.64$ ,  $p<0.001$ ) and vimentin ( $R=0.58$  and  $R=0.41$ ,  $p<0.001$ ) but not with that of E-cadherin (Fig. 1B). In agreement with the meta-analyses, we found increased expression of ADAM12L and ADAM12S in Basal B cell lines compared with Luminal/BasalA cell lines. To further validate the association of ADAM12 expression with EMT, we used primary human mammary epithelial cells (HMECs), immortalized by hTERT and Ras (HMEC-TR) or by SV40 large T, hTERT and Ras (HMEC-LTR) that we treated with TGF- $\beta$  to induce EMT as previously described [39]. We showed again that ADAM12

expression is highly induced in TGF- $\beta$ -treated cells with mesenchymal phenotype and this expression is correlated with vimentin and N-cadherin expression (S1 Fig.).

To investigate the physiological relevance of these observations, we next analyzed the expression of ADAM12 in 79 breast tumor samples. Steady-state ADAM12L and ADAM12S, N-cadherin, vimentin, TGF- $\beta$  and E-cadherin mRNA levels were measured by real-time PCR. As shown in Fig. 2A, expression of ADAM12L and ADAM12S was significantly correlated with that of N-cadherin ( $R=0.52$  and  $R=0.44$ ,  $p<0.001$ ), vimentin ( $R=0.55$  and  $R=0.70$ ,  $p<0.001$ ) and TGF- $\beta$  ( $R=0.61$  and  $R=0.46$ ,  $p<0.001$ ) but not with that of E-cadherin. As previously demonstrated in liver cancer [6], ADAM12L and ADAM12S mRNA levels were highly correlated ( $R=0.79$ ,  $p<0.001$ ). Importantly, the increased expression of ADAM12L ( $0.8\pm0.9$  versus  $1.2\pm1.1$ ,  $p<0.05$ ) and ADAM12S ( $0.7\pm0.9$  versus  $1\pm1.3$ ,  $p<0.05$ ) in breast samples was associated with the presence of metastases supporting evidences for the involvement of ADAM12 in human tumor aggressiveness (Fig. 2B). Together, these data demonstrated that expression of ADAM12 is correlated with the expression of EMT markers in breast cancers and confirmed the association of ADAM12 expression with aggressiveness.

## **ADAM12 expression is induced in epithelial cells that undergo TGF- $\beta$ -dependent EMT.**

To characterize the dynamics of ADAM12 expression during EMT, we used the non-transformed human breast mammary epithelial cell line MCF10A. As expected, TGF- $\beta$  treatment rapidly induced the expression of the mesenchymal marker vimentin and reduced the expression of the epithelial marker E-cadherin (Fig. 3A). ADAM12 which is not expressed in epithelial cells at the basal state (time 0) is detected at 48 hours and significantly increased 96 hours after the onset of TGF- $\beta$  stimulation. Western blotting identified expression of a 110kDa band corresponding to the ADAM12L preform, the mature form being undetectable in these conditions. As control, epithelial cells treated with the T $\beta$ RI inhibitor, SB431542 did not show mesenchymal transition and ADAM12L expression. Using immunofluorescence experiments, we confirmed decrease of E-cadherin, increase of vimentin staining and actin fibers formation after TGF $\beta$  treatment (S2 Fig.).

To confirm the association of ADAM12L expression with EMT in mammary epithelial MCF10A cells, we showed that Kras-transformed MCF10A cells which display EMT phenotype highly expressed ADAM12L (Fig. 3B). Because TGF- $\beta$ -induced EMT has been associated with changes in TGF- $\beta$ -signaling pathways [40], we next analyzed Smad-dependent and Smad-independent pathways in our model. As shown in Fig. 3C, TGF- $\beta$  treatment induced both the Smad-dependent pathway characterized by the phosphorylation of Smad2 and the Smad-independent pathways characterized by the phosphorylation of Akt and p38 MAPK. Our results demonstrate that the expression of ADAM12L is induced in non-malignant breast epithelial cells stimulated by TGF- $\beta$  suggesting that ADAM12L is a new marker for TGF- $\beta$ -dependent EMT.

### **Overexpression of ADAM12L induces mesenchymal phenotype in MCF10A mammary epithelial cells.**

To explore the role of ADAM12L in EMT, we exogenously expressed GFP-ADAM12L C-terminal fusion protein in MCF10A cells using a lentiviral expression system. As illustrated in Fig. 4A and 4B, enforced expression of ADAM12L in MCF10A cells triggered cellular morphologic changes. ADAM12L-overexpressing MCF10A cells exhibited a spindle shape, fibroblast-like phenotype with accumulation of stress fibers and loss of cell-cell contact assessed by dramatic reduction of E-cadherin and increased vimentin immunostaining. By contrast, MCF10A control cells retained an epithelial phenotype that include rounded-shaped cells, high E-cadherin and low vimentin labeling, cortical staining of actin and cell-cell contacts. To investigate the induction of EMT transcriptional program in ADAM12L-overexpressing MCF10A cells, we performed gene expression analyses. We showed a decrease in mRNA levels of the epithelial markers that include E-cadherin and  $\beta$ -catenin and an increase in mRNA levels of mesenchymal markers that include N-cadherin, vimentin, fibronectin and the transcriptional repressors Zeb1 and Twist (Fig. 4C). These results were confirmed by western blotting, showing that E-cadherin is strongly down-regulated whereas vimentin is up-regulated in ADAM12L-overexpressing MCF10A (Fig. 4D). Importantly, silencing ADAM12 expression in ADAM12L-overexpressing MCF10A reverse the expression of the epithelial marker, E-cadherin (Fig. 4E and 4F).

Because we have previously shown that ADAM12 overexpression modulates Smad-dependent TGF- $\beta$  and PI3K/Akt pathways [22,24], we investigated the activation of signaling pathways in ADAM12L-overexpressing MCF10A cells. As illustrated in Fig. 4G, ADAM12L-overexpressing cells showed significant increase amount of phosphorylated forms of Smad3 (<sup>Ser423/Ser425</sup>P-Smad3), Akt (<sup>Ser473</sup>P-Akt) and ERK (<sup>Thr202/Tyr204</sup>P-ERK), while phosphorylation of Smad2 (<sup>Ser465/Ser467</sup>P-Smad2), p38 (<sup>Thr180/Tyr182</sup>P-p38) and JNK (<sup>Thr183/Thr185</sup>P-JNK) was not significantly modified (not shown). Interestingly the increase in Smad3 phosphorylation was always more pronounced than for Smad2 suggesting that the effect of ADAM12L is more likely Smad3-specific. In accordance with this, Smad3 but not Smad2 has been shown critical to induce TGF- $\beta$ -mediated EMT [41,42]. Note that the expression of both immature (137 kDa) and activated (117 kDa) GFP-ADAM12L forms was detected in ADAM12L-overexpressing MCF10A cells suggesting that the maturation process is functional in these cells.

### **ADAM12L-induced EMT is independent of its catalytic activity but requires its cytoplasmic tail.**

To further explore the molecular mechanisms underlying this novel modulation of EMT by ADAM12L, we next compared MCF10A cells which exogenously expressed either ADAM12L or the catalytically deficient ADAM12-E351Q mutant or the short ADAM12S form. As illustrated in Fig. 5A, the catalytically deficient ADAM12-E351Q mutant induced a mesenchymal phenotype to an extent similar to that of wild-type ADAM12L suggesting that proteolytic activity of ADAM12L is not required for EMT induction. In contrast, ADAM12S-overexpressing MCF10A cells retained an epithelial phenotype demonstrating that ADAM12L is specifically involved in EMT. To validate these observations, we next quantified the amount of the epithelial marker E-cadherin and the mesenchymal marker vimentin. In accordance with the mesenchymal phenotype, we found a significant increased expression of vimentin and a decreased expression of E-cadherin in ADAM12L- and ADAM12-E351Q mutant-overexpressing cells (Fig. 5B). In contrast, E-cadherin and vimentin expression in ADAM12S-overexpressing cells was similar to that of control cells demonstrating the differential role of the two forms of ADAM12. To further investigate the mechanisms involved in ADAM12L-induced EMT, we generated MCF10A cells overexpressing

cytoplasmic domain deletion mutant (ADAM12L-Δcyto). As shown in Fig. 6, the cytoplasmic tail is required for the ADAM12L-induced EMT since overexpression of the deletion mutant failed to induce a mesenchymal phenotype but retained high cadherin expression and cell-cell contacts. As previously reported, ADAM12L-Δcyto is targeted to the cell membrane [43].

## **Overexpression of ADAM12L induces chemoresistance.**

Because EMT phenotype has been associated with chemoresistance, we investigated the effects of cisplatin on ADAM12L-overexpressing cells. As shown in Fig. 7A, ADAM12L overexpression confers resistance to cisplatin-induced death. This effect is correlated with a decrease in caspase 3/7 activity. In accordance with these results, we showed that ADAM12L-overexpressing cells are protected against FasL-induced apoptosis supporting the implication of ADAM12L in death resistance (Fig. 7B). As expected, ADAM12LΔCyto- and ADAM12S-overexpressing cells did not show significant resistance to cisplatin while ADAM12L-E351Q-overexpressing cells are chemoresistant to a similar extent that of ADAM12L-overexpressing cells (Fig. 7C). This effect of ADAM12L is specific of the non-cancerous human breast epithelial cell line MCF10A since overexpression of ADAM12L in MCF7, MDA-MB231 and MDA-MB436 cells did not induce cisplatin chemoresistance (S3A Fig.). Accordingly, overexpression of ADAM12L in these breast cancer cell lines did not modify E-cadherin and vimentin expression (S3B Fig.).

Together, these results demonstrate that expression of ADAM12L in the non-malignant breast epithelial cell line MCF10A induces a mesenchymal phenotype linked to the acquisition of chemoresistance. Of note, these effects are associated with a decrease in cell proliferation without changes in migration and invasion (S4 Fig.).

## **ADAM12L expression contributes to EMT through TGF-β receptor-dependent and independent pathways**

Because ADAM12L expression is induced during TGF-β-induced EMT (Fig. 3) and because ADAM12L overexpression is sufficient to induce EMT (Fig. 4), we next investigated the overlaps between TGF-β and ADAM12L effects in promoting EMT. For that purpose, we compared the effect of TGF-β treatment of ADAM12L-overexpressing MCF10A cells with that of control cells.

As illustrated in Fig. 8A, we observed a stronger decrease in E-cadherin and a higher increase in vimentin expression in ADAM12L-overexpressing cells compared to control cells. This effect is sensitive to the concentration of TGF- $\beta$  for E-cadherin expression while the amount of vimentin between ADAM12L-overexpressing cells and controls differed only for weak TGF- $\beta$  concentration since TGF- $\beta$  treatment rapidly saturated the induction of vimentin (Fig. 8B). These data demonstrate that the presence of ADAM12L in epithelial MCF10A cells enhances the effect of TGF- $\beta$  in inducing EMT phenotype. Note that blocking TGF- $\beta$ -dependent induction of endogenous ADAM12L expression in MCF10A slightly but not significantly prevent the E-cadherin decrease and vimentin increase upon TGF- $\beta$  stimulation (S5A-B Fig.). In addition, inhibiting ADAM12 expression in MDA-MB231 and MDA-MB436 mesenchymal cells that express endogenous ADAM12 did not reverse their mesenchymal phenotype (S5C Fig.). Together these data suggest that ADAM12L contributes but is not essential to TGF- $\beta$ -induced EMT in cultured MCF10A cells. In order to further evaluate the overlap between ADAM12L and TGF- $\beta$  effects, we investigated whether the inhibition of TGF- $\beta$  signaling decreased EMT phenotype induced by ADAM12L. For that purpose, cells were treated with a selective inhibitor of TGF $\beta$ R1 (SB431542) that blocks the initialization of TGF- $\beta$  dependent signaling pathways at the receptor level. As shown in Fig. 9A, SB431542 treatment of ADAM12L-overexpressing cells induced a significant increase in E-cadherin expression ( $2 \pm 0.2$  fold,  $p < 0.05$ ) and a slight decrease in vimentin expression ( $0.74 \pm 0.1$  fold,  $p < 0.05$ ) suggesting that inhibition of TGF- $\beta$  receptors partially restored the epithelial phenotype. The efficiency of SB431542 treatment was shown by the decrease in Smad2 phosphorylation. Because expression of ADAM12L is associated with changes of Smad-independent signaling pathways (Fig. 4G), we investigated the effects of ERK and PI3K inhibitors on ADAM12L-induced mesenchymal phenotype. ADAM12L-overexpressing MCF10A cells were incubated with either a highly selective inhibitor of MEK/ERK kinases, U0126 or the specific inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Wortmannin. As shown in Fig. 9B and S6 Fig., U0126 treatment induced a dramatic decrease in vimentin and N-cadherin and an increase in E-cadherin. Unlike U0126, treatments with Wortmannin did not reverse EMT phenotype in ADAM12L-overexpressing cells (Fig. 9C and S6 Fig.). Together, these results provide strong evidence for the implication of TGF $\beta$ R and MEK/ERK-dependent pathways in ADAM12L-induced mesenchymal phenotype.



## Discussion

Epithelial mesenchymal transition is a complex cell-biological program whereby epithelial tumor cells lose polarity and cell-cell adhesion to acquire mesenchymal phenotype. Using transcriptomic data from a large panel of breast cancer cell lines, we demonstrated that ADAM12 clustered with EMT gene signature suggesting that ADAM12 is a component of EMT protein networks. We further showed that expression of ADAM12 is correlated with expression of EMT markers in human breast cancer samples and the presence of metastases. The association of ADAM12 with breast cancer aggressiveness is in accordance with the induction of metastasis *in vivo* by ADAM12-overexpressing breast cell lines [3,15] and the association of ADAM12 with metastases in triple-negative breast cancer [44]. Additionally ADAM12 expression has been recently identified in transcriptomic data from claudin-low tumors [45] which have been previously associated with EMT core signature [46]. Together these studies point out ADAM12 as a new EMT marker.

### ADAM12 is associated with TGF- $\beta$ dependent EMT.

ADAM12 has been identified as a regulator of mesenchymal cell differentiation while its expression has been mainly associated with cancer epithelial cells suggesting that increased ADAM12 expression in tumor cells is associated with dedifferentiation of epithelial cells towards mesenchymal phenotype. This point was clearly demonstrated by our results showing that treatment of the non-malignant breast epithelial cell line MCF10A with TGF- $\beta$  induced EMT and ADAM12 expression. In support of this, ADAM12 expression has been identified as a gene primarily induced in MCF10A cells silenced for TIF1 $\gamma$ , a negative regulator of TGF- $\beta$  transcriptional activity, and characterized by EMT phenotype [47]. Similarly, down-regulation of SnoN, a negative regulator of TGF- $\beta$  signaling, has been shown to enhance both EMT in lung and breast cancer cells [48] and TGF- $\beta$ -induced expression of ADAM12 [49]. Interestingly, there is a direct relationship between ADAM12 expression and cell differentiation processes regulated by TGF- $\beta$ . On one hand, TGF- $\beta$  inhibits mesenchymal cell differentiation promoting progenitor cells proliferation and ADAM12 is mainly associated with undifferentiated proliferative state of mesenchymal cells such as chondrocytes [50], adipocytes [51], myoblasts [52] and osteoblasts [53]. On the other hand, TGF- $\beta$

acts as a major inducer of EMT and we now demonstrate that TGF- $\beta$ -induced ADAM12L expression in epithelial cells is correlated with EMT process. Of note, EMT is associated with the gain of epithelial stem-cell properties [54] and recent findings demonstrated functional association of ADAM12 with TGF- $\beta$ -dependent stem cell differentiation [55] and identified ADAM12 as a marker of embryonic stem cells [56] thereby suggesting that ADAM12 might be an important player in stem cell differentiation.

### **The long but not the short ADAM12 form induces mesenchymal phenotype.**

A major finding in the present study is the demonstration that ADAM12L expression in non-malignant human breast epithelial cell line MCF10A induces phenotypical changes associated with EMT that include loss of cell-cell contact, accumulation of stress fibers and increased expression of specific markers. Importantly we further demonstrate that ADAM12L expression in epithelial cells confers chemoresistance, a known feature of mesenchymal cells. Unlike ADAM12L, the overexpression of ADAM12S does not induce changes in epithelial phenotype. These data are in accordance with the differences previously reported between the long and short forms. ADAM12L but not ADAM12S transcripts were found overexpressed in human non-small-cell lung carcinomas [11] and inversely associated with survival rate in lung adenocarcinoma patients [57]. In human breast cancer, ADAM12L expression has been found higher in early-stage of tumorigenesis, both isoforms being induced in late-stage diseases [15]. Similarly, we show that expression of ADAM12L but not ADAM12S is induced within 48 hours in MCF10A stimulated by TGF- $\beta$  supporting the hypothesis that ADAM12L is an earlier marker of tumor development. However, ADAM12L over-expression does not affect cell motility and does not induced proliferation of normal epithelial cell lines. Absence of changes in motility have been similarly reported in MCF7 breast cell line [15] and lung cancer cell lines [58] and no proliferation was reported in normal breast epithelial [59]. By contrast, ADAM12L overexpression has been shown to promote proliferation of bronchial epithelial immortalized cells [60] and small cell lung carcinoma cell lines [58] suggesting that the effect of ADAM12L depends on the differentiation state of cells.

## **Cooperative effect of ADAM12L and TGF- $\beta$ signaling pathways in EMT.**

The functional mechanism associating ADAM12 and TGF- $\beta$  signaling is supported by our previous work showing that ADAM12 interacts with T $\beta$ RII which recruits T $\beta$ RI to induce TGF- $\beta$  signaling pathways [24]. Numerous ADAM12 interacting proteins are required for TGF- $\beta$  signaling-dependent EMT such as ILK, ITGB1, PIK3R1, Grb2, and Src. Here, we demonstrate for the first time that ADAM12L expression in MCF10A cells results in both phosphorylation of Smad3 and ERK, two key proteins involved in TGF- $\beta$ -mediated EMT[42][61]. Together our data support evidence for the involvement of ADAM12 in activation of pathways similar to that induced by TGF- $\beta$ . In accordance with this hypothesis, we demonstrate that specific inhibitors of T $\beta$ RI (SB431542) and MEK/ERK pathway (U0126) can reverse ADAM12L-induced EMT suggesting that ADAM12L acts through the TGF- $\beta$  receptor and involves ERK pathway in absence of TGF- $\beta$  ligand. An interesting point is that the effects of ADAM12L and TGF- $\beta$  ligand are additive thereby providing evidences for a cooperative role of ADAM12L during the course of TGF- $\beta$ -induced EMT. Because ADAM12 expression is induced by TGF- $\beta$  [6][62] and that activation of signaling pathways occurs independently of TGF- $\beta$  stimulation in ADAM12L-overexpressing cells, ADAM12L could induce ligand-independent activation of TGF- $\beta$  receptors-dependent pathways. Similarly, changes of ADAM12-overexpressing cells toward mesenchymal-like phenotype could be associated with secretion of new potential ligands for TGF- $\beta$  receptors. In support of this hypothesis, type I collagen which is produced by numerous mesenchymal cells and which regulates ADAM12 translocation to the membrane [26] has been shown to activates EMT through Smad3-dependent pathways in absence of TGF- $\beta$  stimulation [63].

To conclude, our present study establishes ADAM12 as a new EMT marker in human breast cancers. Importantly, expression of ADAM12L in non-malignant breast epithelial cells promotes EMT through TGF- $\beta$  receptor-dependent pathways involving ERK phosphorylation. These findings support new functions for ADAM12L in cancer acting as a signaling molecule that contributes to the complexity of TGF- $\beta$  signaling pathways in EMT process.

## Acknowledgments

We would like to express our thanks to Dr. U. Wewer (University of Copenhagen, Denmark) for providing the ADAM12 constructs, to the vector core of the University Hospital of Nantes supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) for providing the HEK293T cells, to Dr Robert A. Weinberg and Dr Ben Ho Park for providing HMEC-derivatives and Ras-transformed MCF10A cell lines, respectively and to the Biosit core facilities from University of Rennes 1 for microscopy, the L3 laboratory and the flow fluocytometry analyses.

494

## 495 **References**

496

- 497 1. Reiss K, Saftig P. The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases:  
498 physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20: 126–137.  
499 doi:10.1016/j.semcdb.2008.11.002
- 500 2. Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM. Cysteine-rich domain of human  
501 ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol.* 1999;154: 1489–1501.
- 502 3. Kveiborg M, Fröhlich C, Albrechtsen R, Tischler V, Dietrich N, Holck P, et al. A role for  
503 ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. *Cancer Res.* 2005;65: 4754–  
504 4761. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0262
- 505 4. Lendeckel U, Kohl J, Arndt M, Carl-McGrath S, Donat H, Röcken C. Increased  
506 expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J*  
507 *Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131: 41–48. doi:10.1007/s00432-004-0619-y
- 508 5. Mitsui Y, Mochizuki S, Kodama T, Shimoda M, Ohtsuka T, Shiomi T, et al. ADAM28 is  
509 overexpressed in human breast carcinomas: implications for carcinoma cell proliferation through  
510 cleavage of insulin-like growth factor binding protein-3. *Cancer Res.* 2006;66: 9913–9920.  
511 doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0377
- 512 6. Le Pabic H, Bonnier D, Wewer UM, Coutand A, Musso O, Baffet G, et al. ADAM12 in  
513 human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix  
514 remodeling. *Hepatology* Baltim Md. 2003;37: 1056–1066. doi:10.1053/jhep.2003.50205
- 515 7. Kodama T, Ikeda E, Okada A, Ohtsuka T, Shimoda M, Shiomi T, et al. ADAM12 is  
516 selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell  
517 proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am J Pathol.* 2004;165:  
518 1743–1753. doi:10.1016/S0002-9440(10)63429-3
- 519 8. Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Röcken C. The disintegrin-  
520 metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J*  
521 *Oncol.* 2005;26: 17–24.
- 522 9. Kornberg LJ, Villaret D, Popp M, Lui L, McLaren R, Brown H, et al. Gene expression  
523 profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity shows abnormalities in several signaling  
524 pathways. *The Laryngoscope.* 2005;115: 690–698. doi:10.1097/01.mlg.0000161333.67977.93
- 525 10. Fröhlich C, Albrechtsen R, Dyrskjöt L, Rudkjaer L, Ørntoft TF, Wewer UM. Molecular  
526 profiling of ADAM12 in human bladder cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.*  
527 2006;12: 7359–7368. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1066
- 528 11. Rocks N, Paulissen G, Quesada Calvo F, Polette M, Gueders M, Munaut C, et al.  
529 Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-  
530 small-cell lung carcinomas (NSCLC). *Br J Cancer.* 2006;94: 724–730.  
531 doi:10.1038/sj.bjc.6602990
- 532 12. Ohtsuka T, Shiomi T, Shimoda M, Kodama T, Amour A, Murphy G, et al. ADAM28 is  
533 overexpressed in human non-small cell lung carcinomas and correlates with cell proliferation and  
534 lymph node metastasis. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2006;118: 263–273. doi:10.1002/ijc.21324
- 535 13. Tian BL, Wen JM, Zhang M, Xie D, Xu RB, Luo CJ. The expression of ADAM12

(meltrin alpha) in human giant cell tumours of bone. *Mol Pathol* MP. 2002;55: 394–397.

14. Peduto L, Reuter VE, Sehara-Fujisawa A, Shaffer DR, Scher HI, Blobel CP. ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for mouse prostate tumor progression. *Oncogene*. 2006;25: 5462–5466. doi:10.1038/sj.onc.1209536

15. Roy R, Rodig S, Bielenberg D, Zurakowski D, Moses MA. ADAM12 transmembrane and secreted isoforms promote breast tumor growth: a distinct role for ADAM12-S protein in tumor metastasis. *J Biol Chem*. 2011;286: 20758–20768. doi:10.1074/jbc.M110.216036

16. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006;314: 268–274. doi:10.1126/science.1133427

17. Roy R, Wewer UM, Zurakowski D, Pories SE, Moses MA. ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *J Biol Chem*. 2004;279: 51323–51330. doi:10.1074/jbc.M409565200

18. Narița D, Anghel A, Seclaman E, Ilina R, Cireap N, Ursoniu S. Molecular profiling of ADAM12 gene in breast cancers. *Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol*. 2010;51: 669–676.

19. Pories SE, Zurakowski D, Roy R, Lamb CC, Raza S, Exarhopoulos A, et al. Urinary metalloproteinases: noninvasive biomarkers for breast cancer risk assessment. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2008;17: 1034–1042. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0365

20. Fröhlich C, Nehammer C, Albrechtsen R, Kronqvist P, Kveiborg M, Sehara-Fujisawa A, et al. ADAM12 produced by tumor cells rather than stromal cells accelerates breast tumor progression. *Mol Cancer Res MCR*. 2011;9: 1449–1461. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0100

21. Kveiborg M, Albrechtsen R, Couchman JR, Wewer UM. Cellular roles of ADAM12 in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40: 1685–1702. doi:10.1016/j.biocel.2008.01.025

22. Leyme A, Bourd-Boittin K, Bonnier D, Falconer A, Arlot-Bonnemains Y, Théret N. Identification of ILK as a new partner of the ADAM12 disintegrin and metalloprotease in cell adhesion and survival. *Mol Biol Cell*. 2012;23: 3461–3472. doi:10.1091/mbc.E11-11-0918

23. Joshi A, Cao D. TGF-beta signaling, tumor microenvironment and tumor progression: the butterfly effect. *Front Biosci Landmark Ed*. 2010;15: 180–194.

24. Atfi A, Dumont E, Colland F, Bonnier D, L'hélgoualc'h A, Prunier C, et al. The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor. *J Cell Biol*. 2007;178: 201–208. doi:10.1083/jcb.200612046

25. Gruel J, Leborgne M, LeMeur N, Théret N. In silico investigation of ADAM12 effect on TGF-beta receptors trafficking. *BMC Res Notes*. 2009;2: 193. doi:10.1186/1756-0500-2-193

26. Bourd-Boittin K, Le Pabic H, Bonnier D, L'Hélgoualc'h A, Théret N. RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis. *J Biol Chem*. 2008;283: 26000–26009. doi:10.1074/jbc.M709829200

27. Okano K, Schnaper HW, Bomsztyk K, Hayashida T. RACK1 binds to Smad3 to modulate transforming growth factor-beta1-stimulated alpha2(I) collagen transcription in renal tubular epithelial cells. *J Biol Chem*. 2006;281: 26196–26204. doi:10.1074/jbc.M606710200

28. Serrano I, McDonald PC, Lock FE, Dedhar S. Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGFβ-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Oncogene*. 2013;32: 50–60. doi:10.1038/onc.2012.30

29. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15: 178–196. doi:10.1038/nrm3758
30. Stautz D, Sanjay A, Hansen MT, Albrechtsen R, Wewer UM, Kveiborg M. ADAM12 localizes with c-Src to actin-rich structures at the cell periphery and regulates Src kinase activity. *Exp Cell Res.* 2010;316: 55–67. doi:10.1016/j.yexcr.2009.09.017
31. Thodeti CK, Fröhlich C, Nielsen CK, Takada Y, Fässler R, Albrechtsen R, et al. ADAM12-mediated focal adhesion formation is differently regulated by beta1 and beta3 integrins. *FEBS Lett.* 2005;579: 5589–5595. doi:10.1016/j.febslet.2005.09.024
32. Galliher AJ, Schiemann WP. Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res BCR.* 2006;8: R42. doi:10.1186/bcr1524
33. Garcia AI, Buisson M, Bertrand P, Rimokh R, Rouleau E, Lopez BS, et al. Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol Med.* 2011;3: 279–290. doi:10.1002/emmm.201100136
34. Konishi H, Karakas B, Abukhdeir AM, Luring J, Gustin JP, Garay JP, et al. Knock-in of mutant K-ras in nontumorigenic human epithelial cells as a new model for studying K-ras mediated transformation. *Cancer Res.* 2007;67: 8460–8467. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0108
35. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* 2001;15: 50–65.
36. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006;10: 515–527. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
37. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y-L, Girard L, Gandhi J, et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS One.* 2009;4: e6146. doi:10.1371/journal.pone.0006146
38. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96: 9212–9217.
39. Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS One.* 2008;3: e2888. doi:10.1371/journal.pone.0002888
40. Moustakas A, Heldin C-H. Induction of epithelial-mesenchymal transition by transforming growth factor  $\beta$ . *Semin Cancer Biol.* 2012;22: 446–454. doi:10.1016/j.semcancer.2012.04.002
41. Dzwonek J, Preobrazhenska O, Cazzola S, Conidi A, Schellens A, van Dinther M, et al. Smad3 is a key nonredundant mediator of transforming growth factor beta signaling in Nme mouse mammary epithelial cells. *Mol Cancer Res MCR.* 2009;7: 1342–1353. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0558
42. Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, Saika S, et al. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17: 19–27. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.09.008
43. Stautz D, Sanjay A, Hansen MT, Albrechtsen R, Wewer UM, Kveiborg M. ADAM12 localizes with c-Src to actin-rich structures at the cell periphery and regulates Src kinase activity.

Exp Cell Res. 2010;316: 55–67. doi:10.1016/j.yexcr.2009.09.017

44. Li H, Duhachek-Muggy S, Qi Y, Hong Y, Behbod F, Zolkiewska A. An essential role of metalloprotease-disintegrin ADAM12 in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;135: 759–769. doi:10.1007/s10549-012-2220-4

45. Li H, Duhachek-Muggy S, Dubnicka S, Zolkiewska A. Metalloproteinase-disintegrin ADAM12 is associated with a breast tumor-initiating cell phenotype. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139: 691–703. doi:10.1007/s10549-013-2602-2

46. Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 15449–15454. doi:10.1073/pnas.1004900107

47. Hesling C, Fattet L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, Lopez J, et al. Antagonistic regulation of EMT by TIF1 $\gamma$  and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep.* 2011;12: 665–672. doi:10.1038/embor.2011.78

48. Zhu Q, Krakowski AR, Dunham EE, Wang L, Bandyopadhyay A, Berdeux R, et al. Dual role of SnoN in mammalian tumorigenesis. *Mol Cell Biol.* 2007;27: 324–339. doi:10.1128/MCB.01394-06

49. Solomon E, Li H, Duhachek Muggy S, Syta E, Zolkiewska A. The role of SnoN in transforming growth factor beta1-induced expression of metalloprotease-disintegrin ADAM12. *J Biol Chem.* 2010;285: 21969–21977. doi:10.1074/jbc.M110.133314

50. Okada A, Mochizuki S, Yatabe T, Kimura T, Shiomi T, Fujita Y, et al. ADAM-12 (meltrin alpha) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor binding protein 5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 2008;58: 778–789. doi:10.1002/art.23262

51. Masaki M, Kurisaki T, Shirakawa K, Sehara-Fujisawa A. Role of meltrin {alpha} (ADAM12) in obesity induced by high- fat diet. *Endocrinology.* 2005;146: 1752–1763. doi:10.1210/en.2004-1082

52. Cao Y, Zhao Z, Gruszczynska-Biegala J, Zolkiewska A. Role of metalloprotease disintegrin ADAM12 in determination of quiescent reserve cells during myogenic differentiation in vitro. *Mol Cell Biol.* 2003;23: 6725–6738.

53. Inoue D, Reid M, Lum L, Krätzschmar J, Weskamp G, Myung YM, et al. Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J Biol Chem.* 1998;273: 4180–4187.

54. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133: 704–715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027

55. Kim YM, Kim J, Heo SC, Shin SH, Do EK, Suh D-S, et al. Proteomic identification of ADAM12 as a regulator for TGF- $\beta$ 1-induced differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. *PloS One.* 2012;7: e40820. doi:10.1371/journal.pone.0040820

56. Kim JJ, Khalid O, Namazi A, Tu TG, Elie O, Lee C, et al. Discovery of consensus gene signature and intermodular connectivity defining self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2014; doi:10.1002/stem.1675

57. Mino N, Miyahara R, Nakayama E, Takahashi T, Takahashi A, Iwakiri S, et al. A disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) is a prognostic factor in resected pathological stage I lung adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 2009;100: 267–272. doi:10.1002/jso.21313



58. Shao S, Li Z, Gao W, Yu G, Liu D, Pan F. ADAM-12 as a Diagnostic Marker for the Proliferation, Migration and Invasion in Patients with Small Cell Lung Cancer. *PloS One*. 2014;9: e85936. doi:10.1371/journal.pone.0085936
59. Qi Y, Duhachek-Muggy S, Li H, Zolkiewska A. Phenotypic Diversity of Breast Cancer-Related Mutations in Metalloproteinase-Disintegrin ADAM12. *PloS One*. 2014;9: e92536. doi:10.1371/journal.pone.0092536
60. Rocks N, Estrella C, Paulissen G, Quesada-Calvo F, Gilles C, Guéders MM, et al. The metalloproteinase ADAM-12 regulates bronchial epithelial cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif*. 2008;41: 988–1001. doi:10.1111/j.1365-2184.2008.00557.x
61. Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia N Y N*. 2004;6: 603–610. doi:10.1593/neo.04241
62. Le Pabic H, L'Helgoualc'h A, Coutant A, Wewer UM, Baffet G, Clément B, et al. Involvement of the serine/threonine p70S6 kinase in TGF-beta1-induced ADAM12 expression in cultured human hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2005;43: 1038–1044. doi:10.1016/j.jhep.2005.05.025
63. DeMaio L, Buckley ST, Krishnaveni MS, Flodby P, Dubourd M, Banfalvi A, et al. Ligand-independent transforming growth factor- $\beta$  type I receptor signalling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol*. 2012;226: 633–644. doi:10.1002/path.3016

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1. ADAM12 is associated with mesenchymal-like phenotype of Basal-B cell lines.** Based on gene expression data of breast cell lines (n=51) from Neve et al.[36] and Kao et al.[37], statistical analyses identified 635 overexpressed genes in Basal-B cell lines compared with Luminal and Basal-A cells (Detailed in S2 Table). (A) Text mining analysis of the 100 most statistically significant upregulated genes in Basal-B cell lines using CoPub tool. Nodes represent genes and edges represent co-citation in abstract. Black lines indicate ADAM12 connections. (B) Spearman correlation analyses of steady-state ADAM12L, ADAM12S, vimentin, E-cadherin and N-cadherin mRNA levels (Top). Comparative distribution of mRNA levels of ADAM12, vimentin, E-cadherin, N-cadherin and TGF- $\beta$  between Lum/Basal-A and Basal B cell lines (Bottom). (\*\*\*,  $p < 0.001$  ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*,  $p < 0.005$ ).

**Fig. 2. Expression of ADAM12 in human breast cancer biopsies (n=79).** ADAM12 expression is correlated with mesenchymal markers (A) and the presence of metastases (B). Total RNA was extracted from breast tissue samples and the steady-state ADAM12L and ADAM12S, N-cadherin, vimentin, TGF- $\beta$  and E-cadherin mRNA levels were measured by real-time PCR. (A) Spearman correlation analyses of steady-state ADAM12L, ADAM12S, vimentin, E-cadherin, N-cadherin and TGF- $\beta$  mRNA levels. (B) Comparative analysis of ADAM12L, ADAM12S and vimentin mRNA levels in breast samples from patients without (-) and with (+) metastases. (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

**Fig. 3. ADAM12 expression is induced in breast epithelial cell line treated with TGF- $\beta$ .** (A), MCF10A cells were stimulated with TGF- $\beta$  (5ng/ml) for 24, 48 and 96 hours and control cells were incubated with the type I TGF- $\beta$  receptor inhibitor, SB431542 (10  $\mu$ M). Concanavalin A-immobilized magnetic nanoparticles were used for selective enrichment of glycoproteins including ADAM12. The levels of vimentin, E-cadherin and ADAM12 were determined by western blot analyses. Top, representative western blots. Bottom, densitometric analyses of protein amounts in cells. Results are expressed as mean $\pm$ SD from 3 independent experiments (\*,  $p < 0.05$ ). (B) Western blot analyses of protein extracts from MCF10A and K-RAS transformed MCF10A epithelial cells

723 cultured for 48h. (C) Cells were stimulated with TGF- $\beta$  (5ng/ml) for 24, 48 and 96 hours and levels  
724 of phosphorylated Ser465/Ser467P-Smad2, Ser473P-Ak and Thr180/Tyr182P-p38 were determined  
725 by western blot analysis. Immunoblots for ADAM12 and actin are shown as controls. Top,  
726 representative western blots. Bottom, densitometric analyses of protein amounts in cells. Results are  
727 expressed as mean $\pm$ SD from 3 independent experiments (\*,  $p<0.05$ ).

728  
729 **Fig. 4. Overexpression of ADAM12L in MCF10A breast epithelial cells induces a**  
730 **mesenchymal phenotype.** MCF10A cells were infected with lentiviruses expressing either GFP-  
731 ADAM12L fusion protein (ADAM12L) or the control protein GFP (Control). After antibiotic  
732 selection, cells were further enriched using flow cytometry and cultured for 48 hours. (A) Bright  
733 field pictures were captured to show cell morphology. (B) Cells were fixed and immunostained for  
734 E-cadherin, vimentin or stained with rhodamine-conjugated phalloidin to monitor actin stress fibers  
735 cytoskeletal actin. (C) Real-time PCR analyses of epithelial (E-cadherin and  $\beta$ -catenin) and  
736 mesenchymal (N-cadherin, vimentin, Zeb1, fibronectin and Twist) markers. Results are expressed  
737 as fold changes in ADAM12L-overexpressing cells compared with control cells. (D) Western blot  
738 analyses of E-cadherin and vimentin in ADAM12L-overexpressing cells. (E and F) ADAM12-  
739 overexpressing MCF10A cells were transfected with 100 nM non-targeted siRNA (siControl) or  
740 ADAM12 siRNA (siADAM12). After 48 hours, E-cadherin expression was analyzed by Western  
741 blotting (E). The efficiency and specificity of RNA interference in cell extracts was confirmed by  
742 ADAM12 blots (F). (G) Western blot analyses of phosphorylated Ser465/Ser467P-Smad2,  
743 Ser423/Ser425P-Smad3, Ser473P-Ak, Thr202/Tyr204P-ERK, Thr180/Tyr182P-p38 and  
744 Thr183/Thr185P-JNK in ADAM12L-overexpressing cells and control cells, 48 hours post-seeding.  
745 Immunoblots for ADAM12L and HSC-70 are shown as control. Left, representative western blots.  
746 Right, densitometric analyses of protein amounts in cells. Results are expressed as mean $\pm$ SD from 3  
747 independent experiments (\*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ).

748  
749 **Fig. 5. ADAM12-dependent EMT does not require catalytic activity and is specific of**  
750 **ADAM12L.** MCF10A cells were infected with lentiviruses expressing either the fusion proteins  
751 GFP-ADAM12L, GFP-ADAM12-E351Q, GFP-ADAM12S or the control protein GFP (Control).  
752 After antibiotic selection, cells were further enriched using flow cytometry and cultured for 48

hours. (A) Bright field pictures were captured to show cell morphology. Cells were fixed and immunostained for E-cadherin or stained with rhodamine-conjugated phalloidin to monitor actin stress fibers cytoskeletal actin. (B) The levels of vimentin and E-cadherin were determined by western blot analyses. Left, representative western blots. Immunoblots for ADAM12L, ADAM12S and HSC-70 are shown as control. Right, densitometric analysis of protein amounts. Results are expressed as mean $\pm$ SD from 6 independent experiments (\*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ).

**Fig. 6. The cytoplasmic tail is required for ADAM12L-induced EMT.** MCF10A cells were infected with lentiviruses expressing either the fusion proteins GFP-ADAM12L, the cytoplasmic domain deletion mutant (GFP-ADAM12L- $\Delta$ cyto) or the control protein GFP (Control). After antibiotic selection, cells were further enriched using flow cytometry and cultured for 48 hours. (A) Cells were fixed and immunostained for E-cadherin (B) The levels of vimentin and E-cadherin were determined by western blot analyses. Left, representative western blots. Immunoblots for ADAM12 and HSC-70 are shown as control. Right, densitometric analysis of protein amounts. Results are expressed as mean $\pm$ SD from 3 independent experiments (\*,  $p<0.05$ ).

**Fig 7. Overexpression of ADAM12L induces chemoresistance in MCF10A cells.** (A) Cisplatin-induced apoptosis is analyzed by quantification of cell viability and caspase 3/7 activity. Dose effects are measured after 24h of treatment and kinetic effects are measured with a dose of 20 $\mu$ g/ml. (B) Fas-L induced apoptosis is analyzed by quantification of cell viability and caspase 3/7 activity. Dose effects are measured after 24h of treatment and kinetic effects are measured with a dose of 75 ng/ml. All results are expressed as the mean  $\pm$ SD from four independent experiments (\*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ). (C) Comparative analysis of cell viability between MCF10A cells overexpressing either ADAM12L, ADAM12L-E315Q, ADAM12L- $\Delta$ cyto or ADAM12S compared with control cells after 24H of cisplatin treatment with a dose of 20 $\mu$ g/ml.

**Fig. 8. ADAM12L expression facilitates TGF- $\beta$ -dependent EMT.** MCF10A overexpressing GFP-ADAM12L or GFP (control) were treated with TGF- $\beta$  for indicated period of time (A) and for increasing concentrations of TGF- $\beta$  (B). Dose effects are measured after 96h of treatment and kinetic effects are measured with a dose of 5ng/ml. The expression of vimentin and E-cadherin

were analyzed by western blot and quantified by densitometry. Top, Results are expressed as ratio of protein expression in GFP-ADAM12L-overexpressing cells to control cells (mean±SD) from four independent experiments (\*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ). Bottom, representative western blots.

**Fig. 9. Inhibition of T $\beta$ RI or ERK-MAPK reverses ADAM12L-induced mesenchymal phenotype.** MCF10A cells overexpressing GFP-ADAM12 were treated (+) or not (-) with (A) the selective inhibitor of TGF $\beta$ RI, SB431542 (10 $\mu$ M), (B) a highly selective inhibitor of both MEK1 and MEK2, U0126 (10 $\mu$ M), and (C) the PI3K inhibitor, Wortmannin (10 $\mu$ M) for 72 hours. The expression of vimentin and E-cadherin was analyzed by western blot and quantified by densitometry. Data are expressed as mean±SD from four independent experiments (\*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ).

## SUPPORTING INFORMATION

**S1 Fig. ADAM12 expression is induced in TGF- $\beta$  treated immortalized HMEC.** Primary human mammary epithelial cells (HMEC) infected with a retrovirus carrying hTERT, H-Ras-V12 Ras and SV40 large T antigen were kindly provided by Dr RA Weinberg (Cambridge, MA, USA) (37). HMECs immortalized by hTERT and Ras were designated HMEC-TR. HMECs immortalized by SV40 large T, hTERT and Ras were designated HMEC-LTR. Cells were treated with 10ng/ml recombinant TGF- $\beta$  for 15 days. Total RNA was extracted and the steady-state ADAM12L and ADAM12S, N-cadherin, vimentin, TGF- $\beta$  were measured by real-time PCR.

**S2 Fig. TGF- $\beta$  induces EMT in MCF10A cells.** MCF10A cells were treated with TGF- $\beta$  and fixed at indicated times. Cells were immunostained for E-cadherin, vimentin or stained with rhodamine-conjugated phalloidin to monitor actin stress fibers cytoskeletal actin.

**S3 Fig. Overexpression of ADAM12L in tumoral mammary cell lines did not modify chemoresistance.** (A) Cisplatin-induced apoptosis is analyzed by quantification of cell viability and caspase 3/7 activity. Dose effects are measured after 24h of treatment and kinetic effects are measured with a dose of 20 $\mu$ g/ml. Dose effects are measured after 24h of treatment and kinetic

effects are measured with a dose of 20 $\mu$ g/ml. All results are expressed as the mean  $\pm$ SD from four independent experiments (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ). (B) Western blot analyses of E-cadherin and vimentin in ADAM12L overexpressing tumor cell lines.

**S4 Fig. Overexpression of ADAM12L does not affect cell migration and reduces cell proliferation.** (A) Control MCF10A or ADAM12L-overexpressing MCF10A cells were subjected to a wound healing assay in presence of mitomycin (2.5  $\mu$ g/ml). The pictures were taken immediately after incision (0 hour) and at 20 hours after incision using a 10 $\times$  objective. The area of wound was quantified using Java's image J software. Left, representative pictures. Right, quantification of data from four independent experiments. (B) Migration assays in Boyden chambers. Left, representative pictures. Right, quantification of data from four independent experiments. (C) Soft agarose colony formation assays. Left, representative pictures. Right, quantification of data from four independent experiments. (D) Proliferation assays. Control MCF10A or ADAM12L-overexpressing MCF10A cells were subjected to MTT assay at 0, 24, 48 and 72h and doubling time was calculated. Results are expressed as the mean  $\pm$ SD from four independent experiments (\*\*,  $p < 0.01$ ).

**S5 Fig. ADAM12 expression is not essential for TGF- $\beta$ -induced EMT.** (A) Validation of effects of Lentiviral shADAM12 Transduction Particles (1, 2 and 3) in ADAM12-overexpressing MCF10A clones (left panel, RT-qPCR). (B) MCF10A clones expressing sh directed against ADAM12 (shADAM12 (1), shADAM12 (2), shADAM12 (3) or control sh (shC)) were treated with TGF- $\beta$  for 96 hours. E-cadherin and vimentin expression was analyzed by western blots and the amount of proteins was quantified by densitometry. Results are expressed as the mean  $\pm$ SD of three independent experiments. (C) Stable and transient transfection of MDA-MB-231 and MDA-MB-436 cells with sh and siRNA targeting ADAM12, respectively. Expression of vimentin and E-cadherin was analyzed 48h after seeding using western blots.

**S6 Fig. Inhibition of T $\beta$ RI or ERK-MAPK reverses ADAM12L-induced mesenchymal phenotype.** MCF10A cells overexpressing GFP-ADAM12 were treated or not with the selective inhibitor of TGF $\beta$ RI, SB431542 (10 $\mu$ M), a highly selective inhibitor of both MEK1 and MEK2,

839 U0126 (10 $\mu$ M), and the PI3K inhibitor, Wortmannin (10 $\mu$ M) for 72 hours. Cells were fixed and  
840 immunostained for E-cadherin.

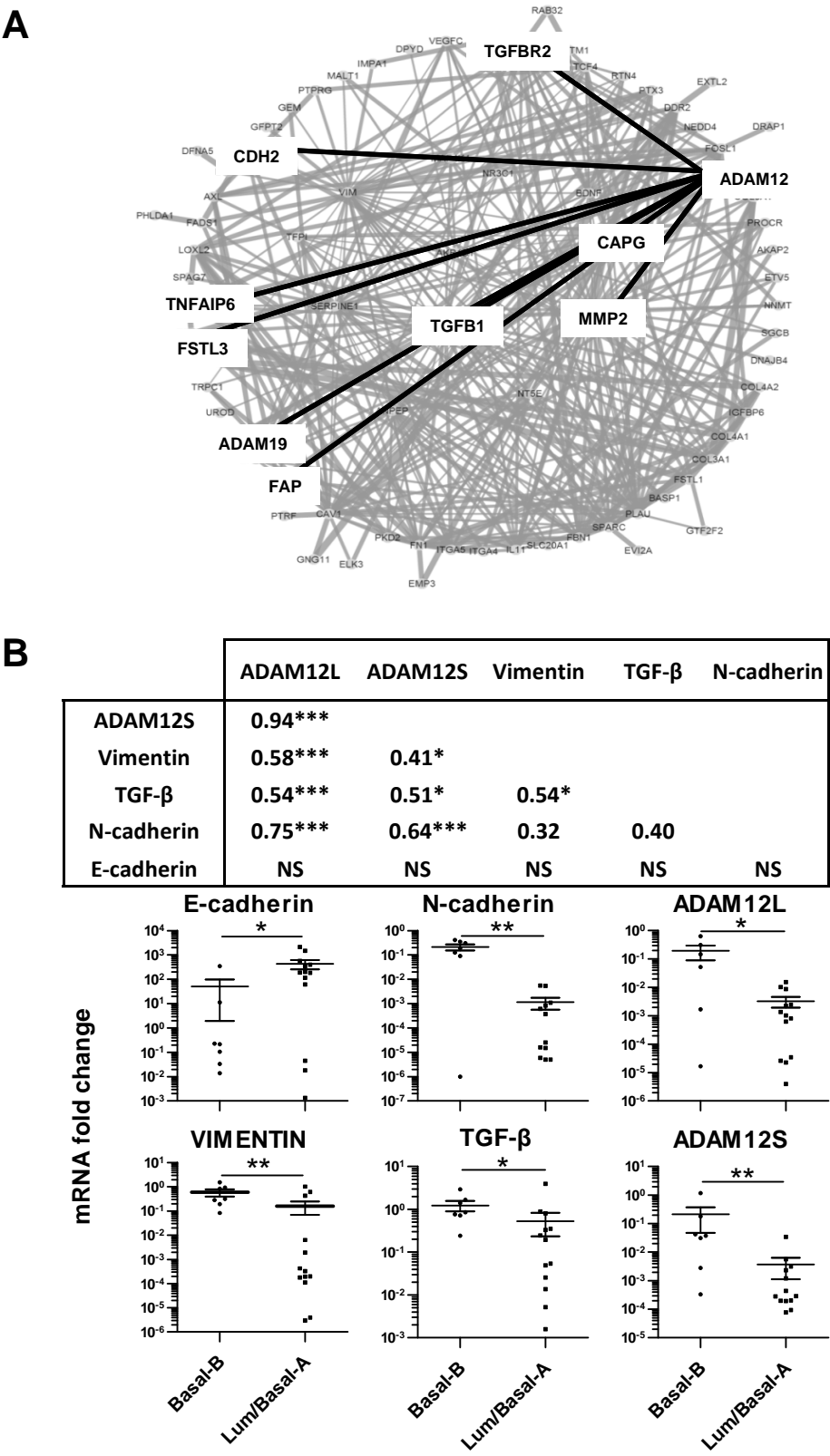
841 **S1 Table. Description of breast cancer cell lines. ER, Estrogen receptor, PR, progesterone**  
842 **receptor, and Her2, human epidermal growth factor receptor 2.**

843  
844 **S2 Table. Common list of genes upregulated in Basal B cell lines compared with Basal A and**  
845 **Luminal cell lines from Kao et al, 2009 and Neve et al, 2006.**

846

847

Fig. 1



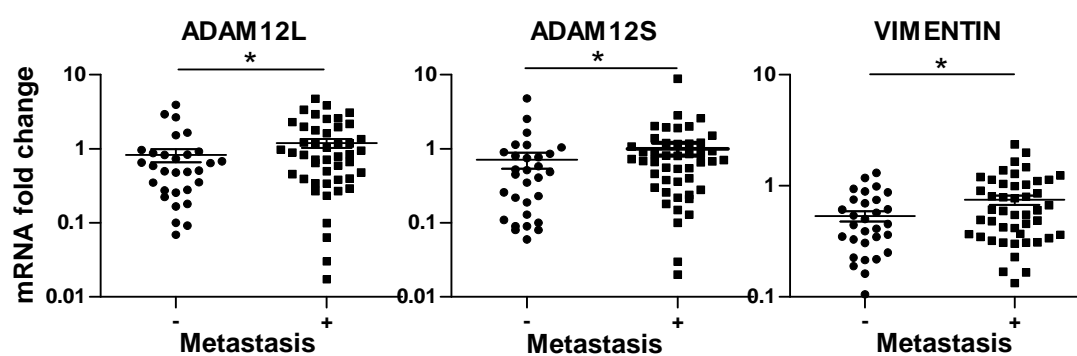


**Fig. 2**

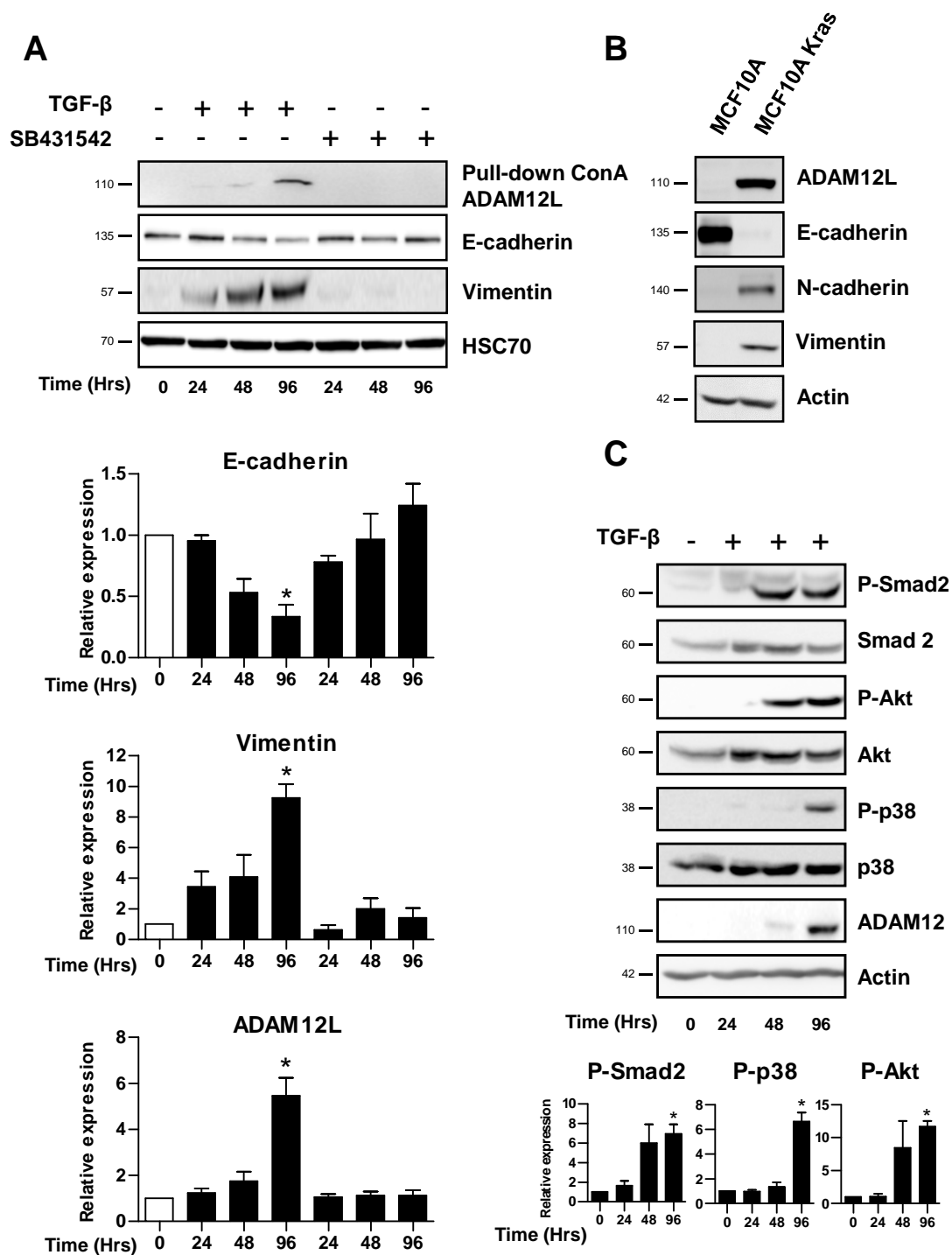
**A**

	ADAM12L	ADAM12S	Vimentin	TGF- $\beta$	N-cadherin
ADAM12S	0.79***				
Vimentin	0.55***	0.70***			
TGF- $\beta$	0.61***	0.46***	0.50***		
N-cadherin	0.52***	0.44***	0.41***	0.40***	
E-cadherin	NS	NS	NS	NS	NS

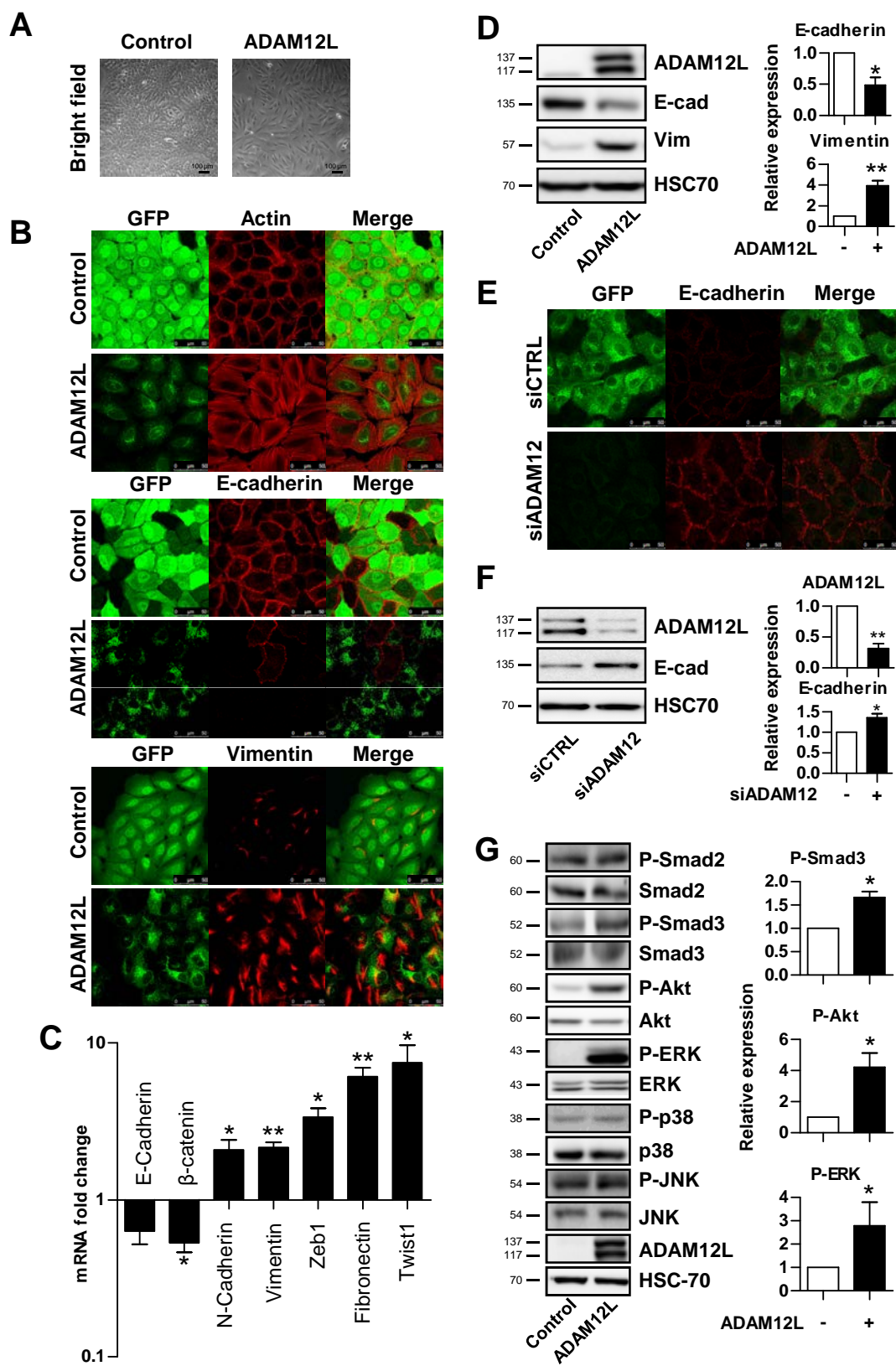
**B**



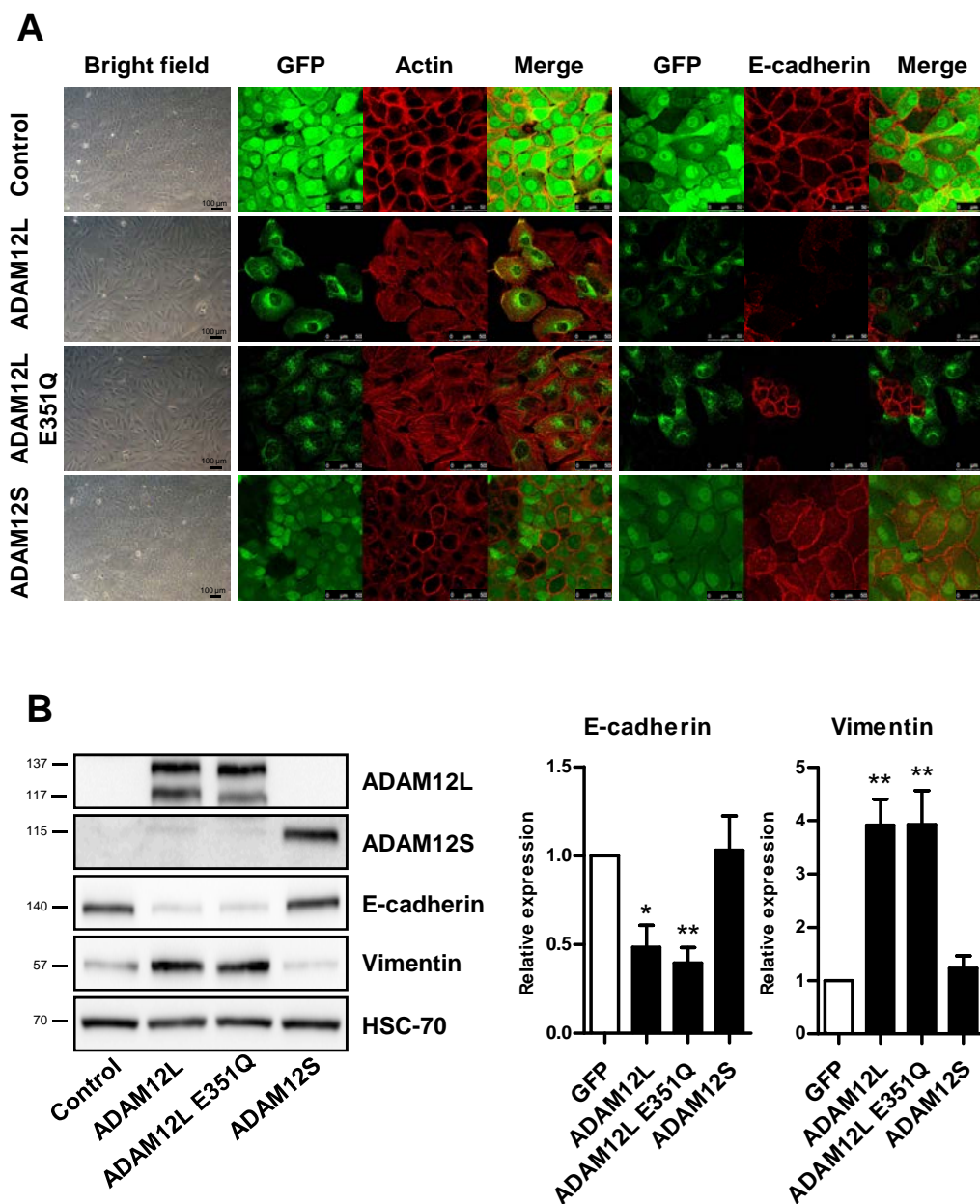
**Fig. 3**



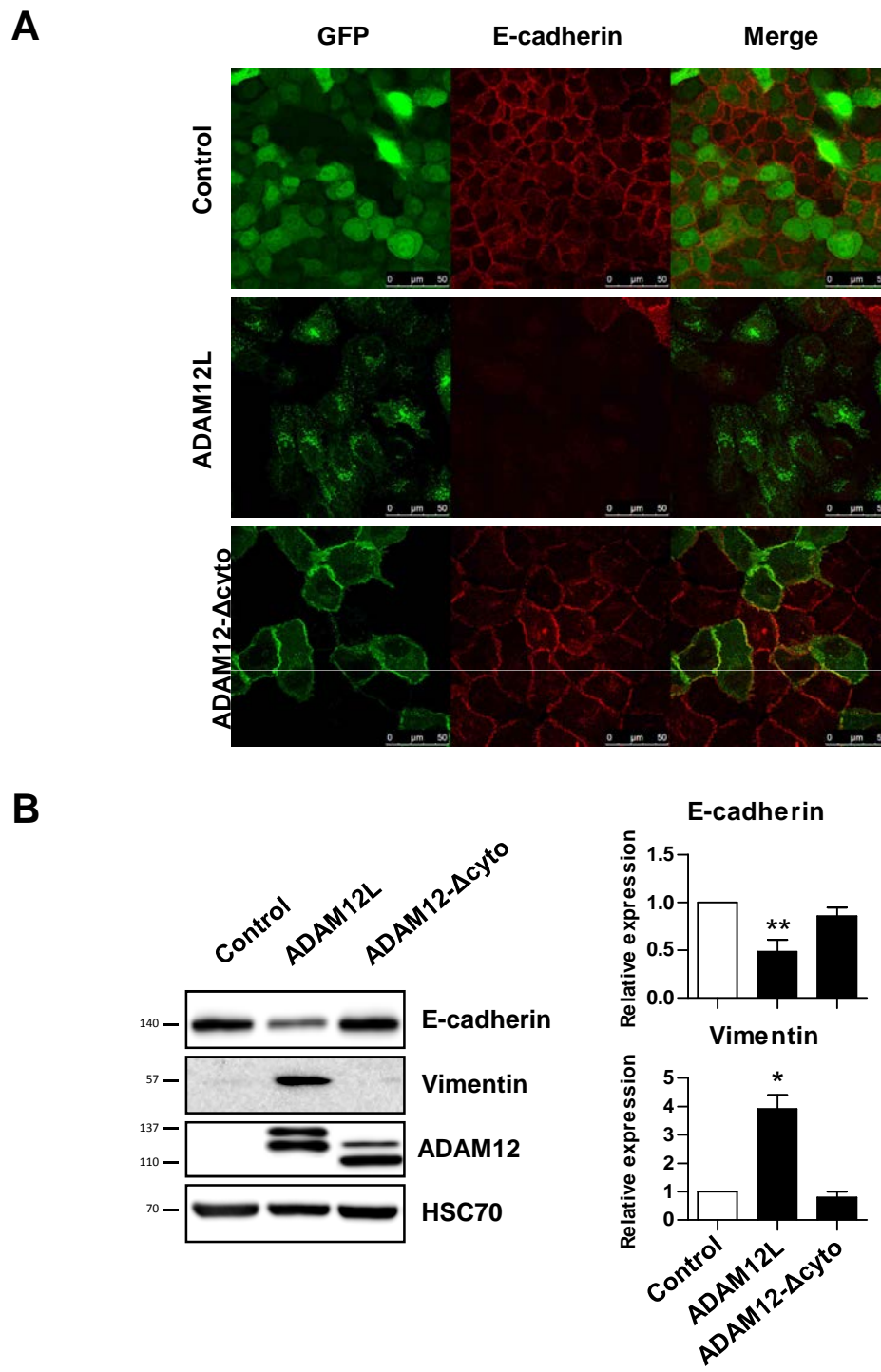
**Fig. 4**



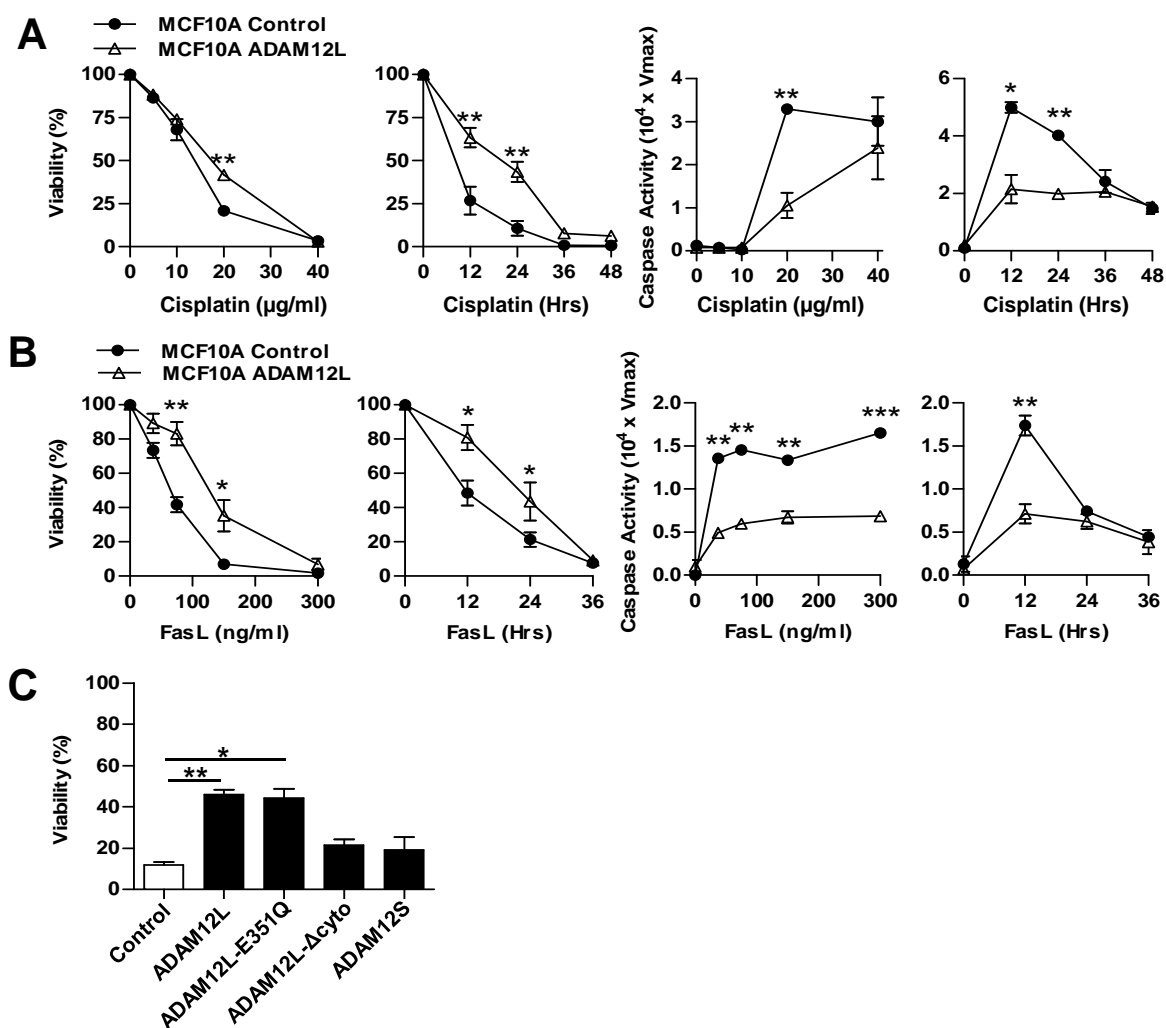
**Fig. 5**



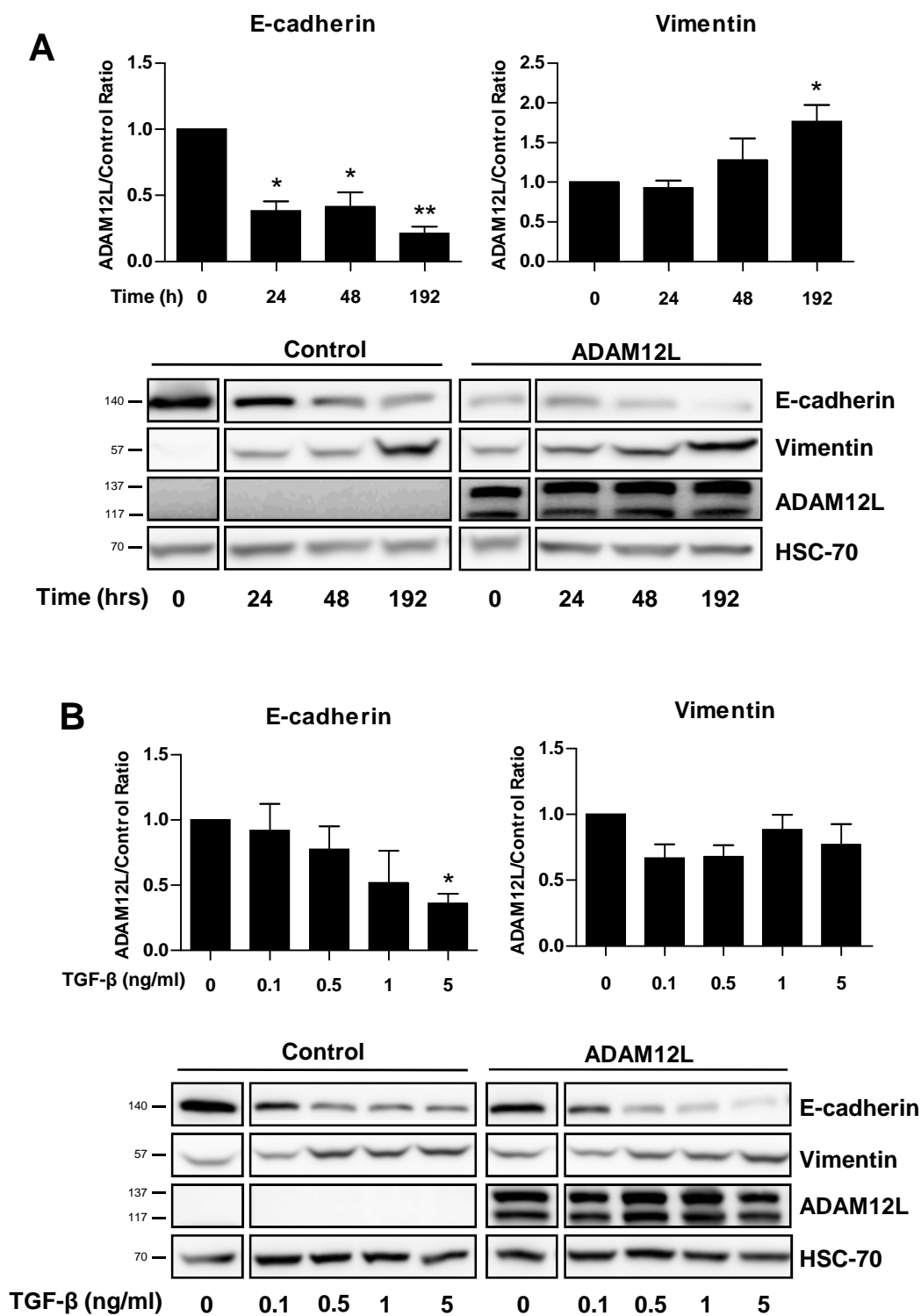
**Fig. 6**



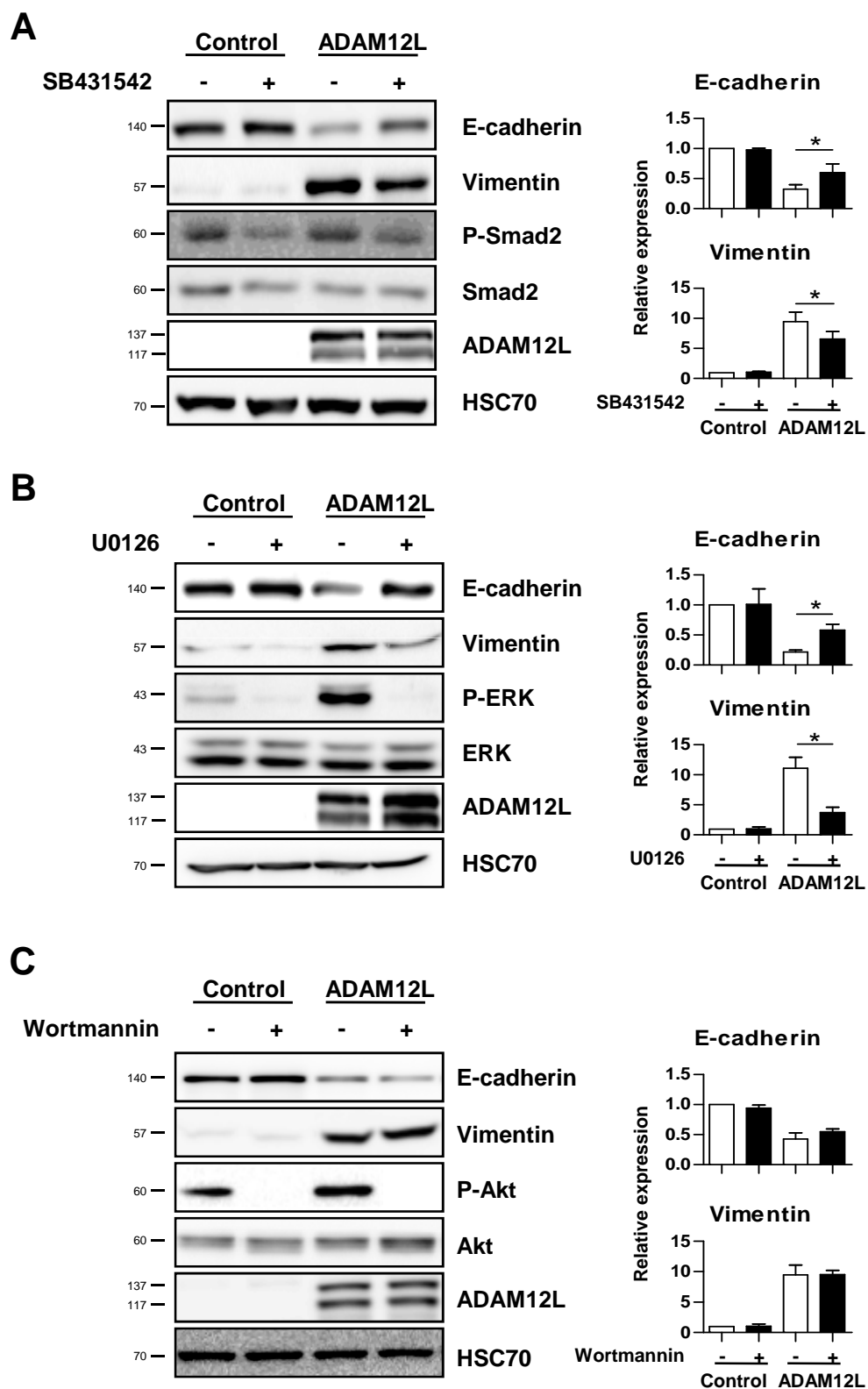
**Fig. 7**



**Fig. 8**

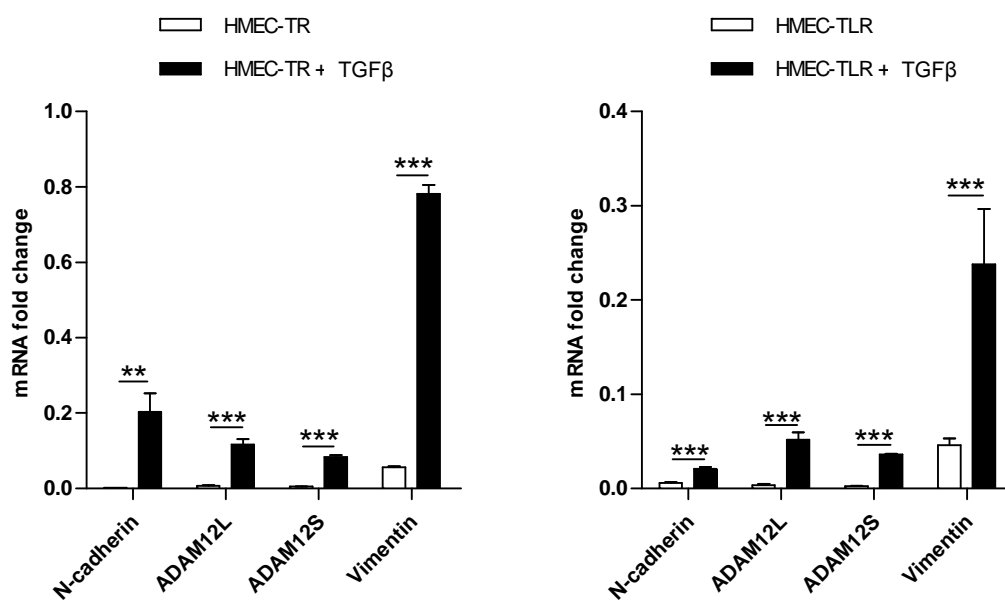


**Fig. 9**

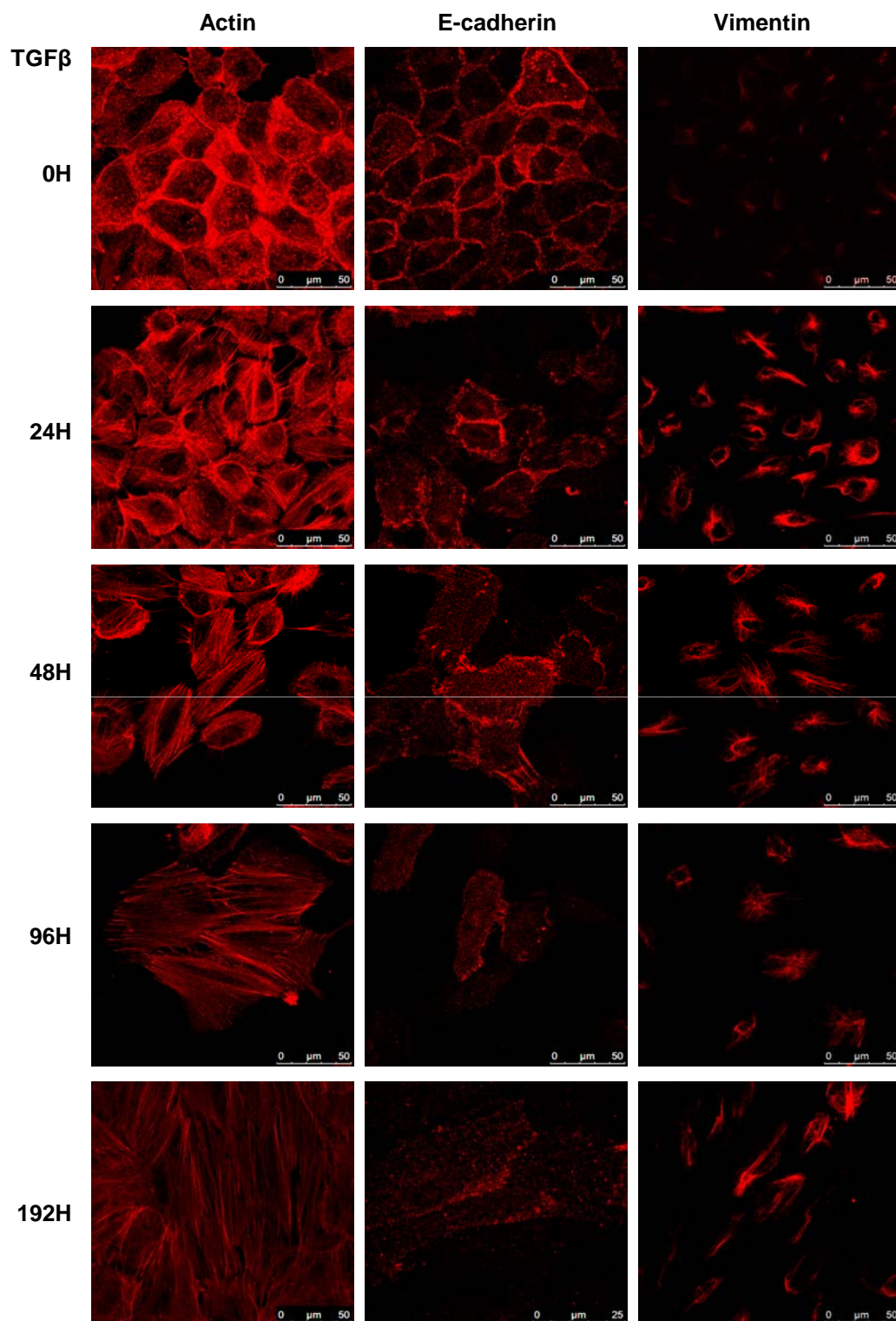




S1 Fig.

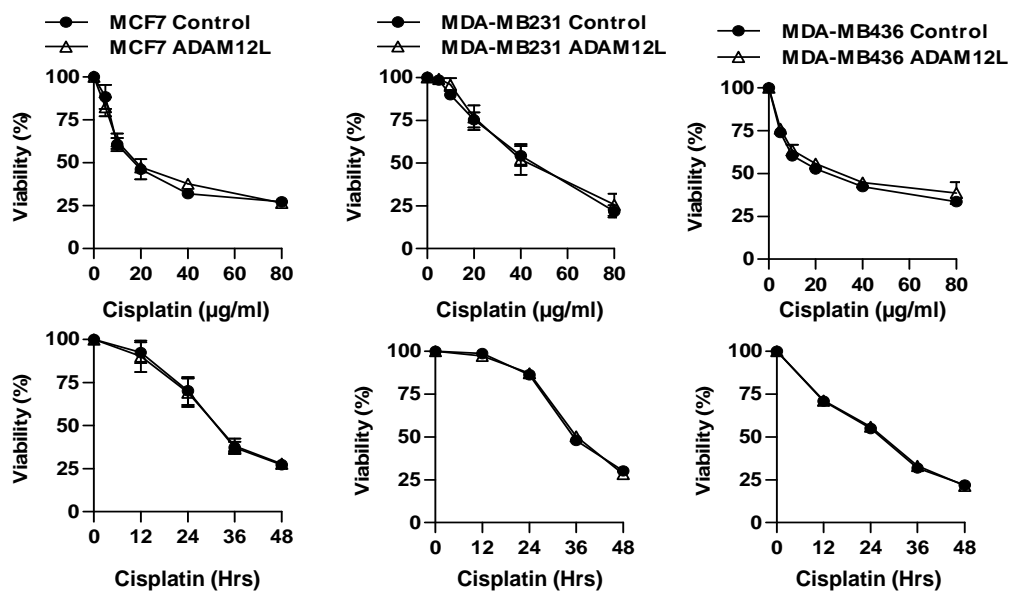


**S2 Fig.**

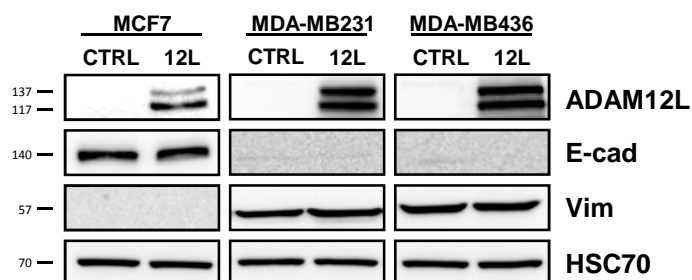


S3 Fig.

**A**

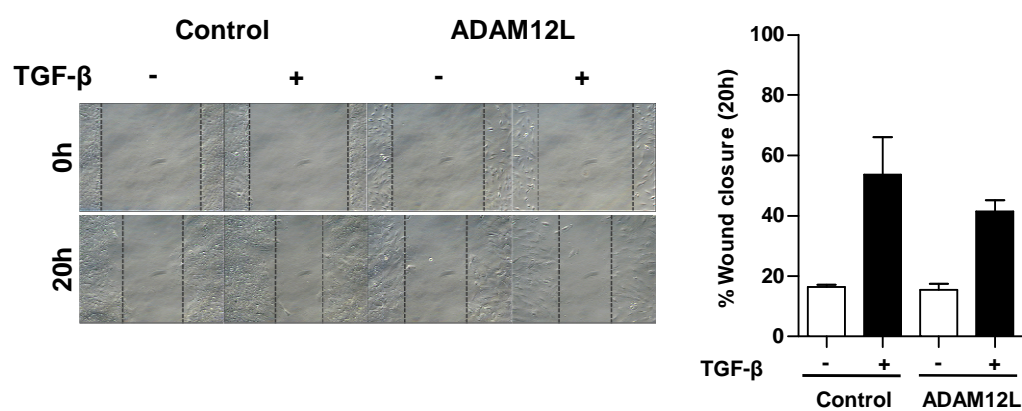


**B**

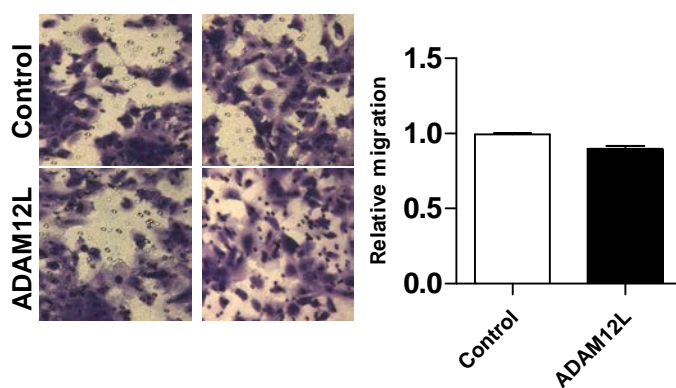


**S4 Fig.**

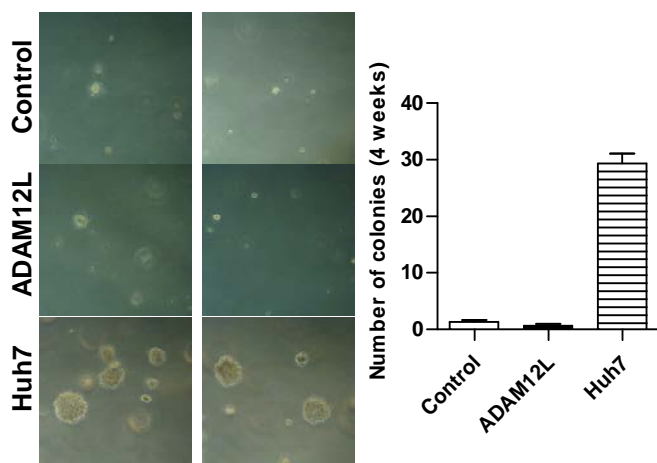
**A**



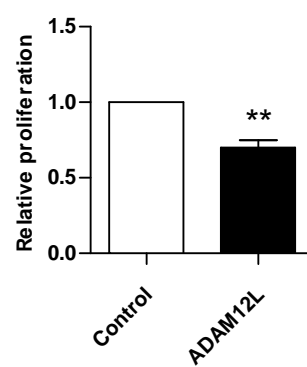
**B**



**C**

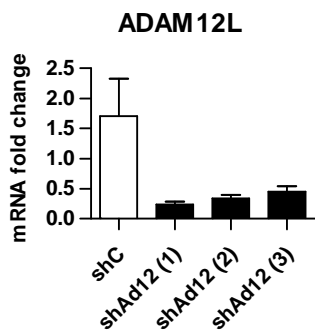


**D**

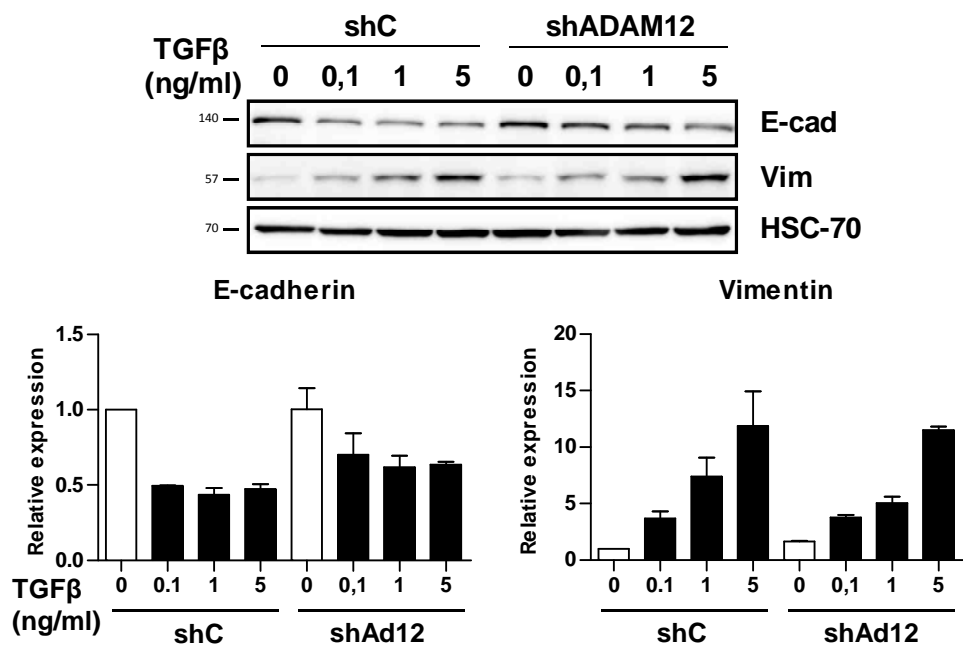


S5 Fig.

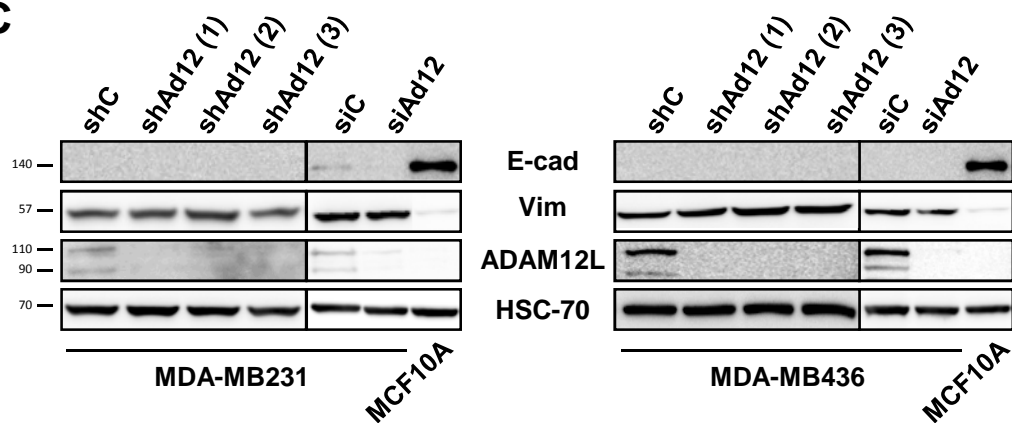
**A**



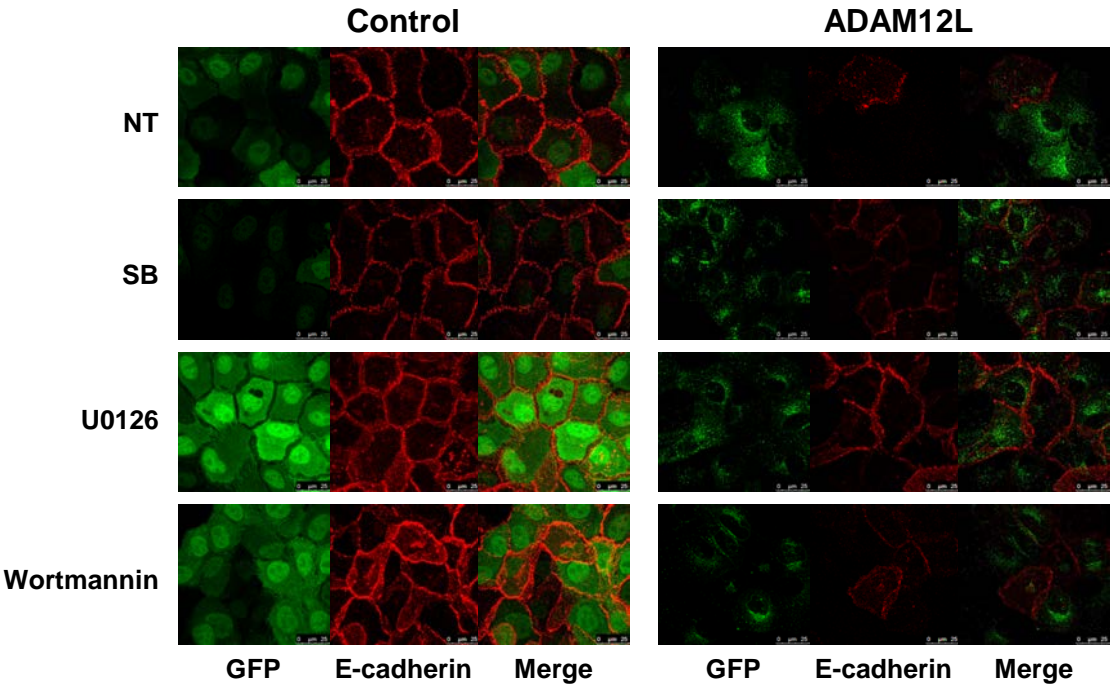
**B**



**C**



S6 Fig.



# RESULTATS COMPLEMENTAIRES

---

Les résultats complémentaires comprennent des informations supplémentaires qui s'inscrivent dans la continuité de la publication. L'ensemble de ces résultats sera discuté dans la discussion générale. Ils sont subdivisés en deux parties. La première évalue plusieurs hypothèses selon lesquelles ADAM12 pourrait fonctionner avec d'autres protéines au niveau des radeaux lipidiques pour induire l'EMT. La seconde partie est une analyse protéomique des partenaires d'ADAM12L, réalisée sur le modèle de surexpression MCF10A-ADAM12L.

## I) Relocalisation d'ADAM12L dans les radeaux lipidiques

### 1.1) TGF $\beta$ et radeaux lipidiques

Beaucoup de récepteurs et les molécules de signalisation qui leur sont associées s'organisent au sein de compartiments membranaires spécifiques appelés "radeaux lipidiques". Ces radeaux lipidiques sont des domaines membranaires dynamiques enrichis en cholestérol et en sphingolipides et sont caractérisés par leur densité et leur insolubilité aux détergents non ioniques.

Les récepteurs au TGF $\beta$  se localisent dans des microdomaines qui contribuent à la dynamique de signalisation et à sa régulation (Roy and Wrana, 2004). Il est ainsi admis que les récepteurs sont internalisés dans l'endosome à partir de zones riches en clathrines, optimisant le signal d'activation des SMADs dans l'endosome précoce alors que l'extinction de ce signal s'effectue via les microdomaines de type radeaux lipidiques au sein desquels les récepteurs colocalisent avec le complexe SMAD7–SMURF2. De façon intéressante, la variabilité des voies de signalisation induites par le TGF $\beta$  a été associée à la localisation des récepteurs au cours de l'EMT. Ainsi, dans des kératinocytes en culture, les voies de signalisation SMAD et AKT sont induites lorsque le récepteur est localisé dans des microdomaines non radeaux lipidiques, alors que les voies MAPK p38 et ERK sont activées dans les radeaux lipidiques (Zuo and Chen, 2009). Dans ce modèle, l'inhibition de la voie AKT n'a pas d'effet sur l'EMT induite par le TGF $\beta$  mais bloque la migration des cellules. En revanche, l'inhibition de la voie ERK ou une perturbation des radeaux lipidiques bloque à la fois l'EMT et la migration induite par le TGF $\beta$ . Ainsi, la localisation du récepteur au TGF $\beta$  dans les radeaux lipidiques est nécessaire à l'EMT induite par le TGF $\beta$ .

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction (chapitre II), la dynamique d'ADAM12 implique aussi sa relocalisation à la membrane dans des microdomaines membranaires. De

façon tout à fait intéressante, ADAM12 a été identifiée dans les radeaux lipidiques de cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (hASCs pour human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stems Cells) traitées au TGF $\beta$ , ces hASC se différenciant en cellules musculaires lisses (SMCs pour Smooth Muscle Cells) (Kim et al., 2012). Par une approche protéomique haut débit combinée à une analyse ontologique, les auteurs ont identifié 21 protéines différentiellement enrichies dans les radeaux lipidiques après traitement des cellules au TGF $\beta$  comparativement à des cellules non traitées (18 positivement et 3 négativement). La liste des protéines est détaillée dans le **Tableau 2**.

Gene Symbole	Log2 ratio	Protéine	Fonction principale
ADAM12	6,23	ADAM metallopeptidase domain 12 (meltrin alpha)	Adhésion cellulaire
LDLR	4,73	Low density lipoprotein receptor	Homéostasie du cholestérol
PKD2	4,44	Polycystic kidney disease 2	Homéostasie du calcium
SDC1	3,58	Syndecan 1	Signalisation
FAS	3,36	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	Apoptose
CTNNB1	2,45	Catenin beta 1	Assemblage des jonctions adhérentes
ADAM10	2,38	ADAM metallopeptidase domain 10	Signalisation
KIDINS220	2,18	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	Activation de ERK
DYSF	1,88	Dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B	Homéostasie du calcium
CD99	1,59	CD99 molecule	Adhésion cellulaire
ATP1B1	1,40	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide	Métabolisme
NCSTN	1,30	Nicastrin	Maturation de protéines
ITGAV	1,03	Integrin, alpha V	Angiogenèse
CALR	1,02	Calreticulin	Homéostasie du calcium
CD47	1,01	CD47 molecule	Homéostasie du calcium
RAP1A	1,00	RAP1A, member of RAS oncogene family	Activation de ERK
ADAM17	0,76	Disintegrin and metalloproteinase 17	Adhésion cellulaire
FLOT1	-0,70	Flotillin-1	Formation des caveolae
FLOT2	-0,33	Flotillin-2	Formation des caveolae
CAV2	-0,99	Caveolin-2	Formation des caveolae
CAV1	-1,64	Caveolin-1	Formation des caveolae

**Tableau 2 : Liste des protéines relocalisées dans les radeaux lipidiques en réponse au TGF $\beta$ .**

*Le score est donné en Log2 du ratio entre la quantité d'une protéine présente dans les radeaux lipidiques de cellules traitées au TGF $\beta$  pendant 72H par rapport aux cellules non traitées. Les scores positifs représentent une relocalisation vers les radeaux lipidiques tandis que les scores négatifs représentent une délocalisation des radeaux lipidiques (Tableau issu de Kim et al., 2012).*

ADAM12 est la protéine avec le score de relocalisation dans les radeaux lipidiques le plus élevé et les auteurs démontrent que l'inhibition de l'expression d'ADAM12 dans les hASCs inhibe la différenciation en SMCs induite par le TGF $\beta$ . Par conséquent, la dynamique



d'ADAM12 pourrait être indispensable à la différenciation des hASCs en SMCs induite par le TGF $\beta$ .

Par analogie avec notre modèle d'EMT induite par le TGF $\beta$  et dans le but de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliquant ADAM12, nous avons cherché les relations entre ces différentes protéines, dont ADAM12, relocalisées dans les radeaux lipidiques en réponse au TGF $\beta$ . Il existe peu de relations fonctionnelles évidentes entre ces différentes protéines. On retrouve 4 protéines impliquées dans l'homéostasie calcique (PKD2, DYSF, CALR et CD47), 3 protéines de la famille ADAM (ADAM12, ADAM10 et ADAM17) impliquées dans le shedding des ligands de l'EGFR et dans l'adhésion cellulaire, ainsi que 2 protéines impliquées dans l'activation des voies de signalisation MAPK, la Kidins220 et Rap1A. Dans notre modèle MCF10A, nous avons montré que l'induction de la voie ERK suite à une surexpression d'ADAM12L était importante puisque son inhibition réversait le phénotype EMT induit par la surexpression d'ADAM12L. La Kidins220 et Rap1 constituent donc des partenaires potentielles intéressantes puisque ces protéines pourraient contribuer à l'activation de la voie ERK dans notre modèle.

Nous nous sommes donc intéressés aux possibles interactions fonctionnelles entre ADAM12L et Rap1A. Dans un premier temps, nous décrirons brièvement les protéines d'intérêt, puis nous présenterons les résultats préliminaires obtenus.

### **1.2) Interactions fonctionnelles d'ADAM12L avec Rap1**

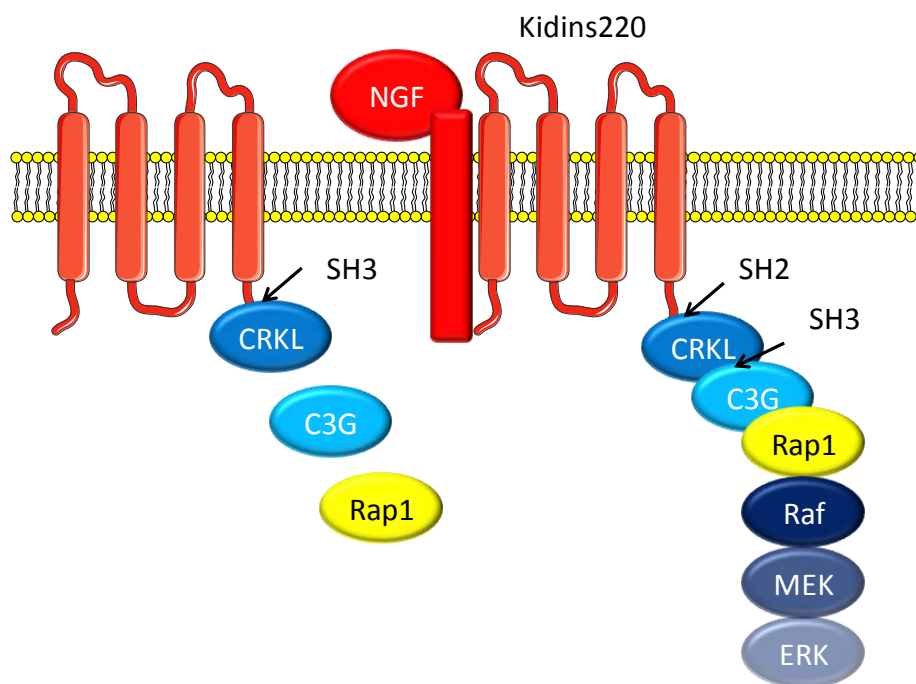
Rap1 est une petite protéine G comme Ras qui est activée par de nombreux stimuli extracellulaires et qui est largement impliquée dans le contrôle de l'adhésion médiée par les intégrines. Elle a été identifiée comme le produit d'un gène réversant la transformation de cellules par K-Ras. Récemment, il a été montré que Rap1 joue un rôle dans la formation des jonctions cellulaires. De façon intéressante, des activateurs de Rap1 comme C3G et PDZ-GEF sont directement liés à la E-cadhérine et d'autres protéines de jonctions. De même, plusieurs protéines de jonctions cellulaires comme AF6 et des protéines contrôlant le cytosquelette d'actine sont des effecteurs de Rap1 ([Kooistra et al., 2007](#)). Balzac *et al.* ont montré que Rap1 est activée lors de l'endocytose (et donc la perte) de la E-cadhérine et qu'en retour elle permet la formation des points d'adhésion focaux via les intégrines, fournissant un relai moléculaire entre les jonctions adhérentes et les points d'adhésion focaux ([Balzac et al., 2005](#)).

Rap1 est liée à la signalisation du TGF $\beta$ . Ainsi l'activation de Rap1 mène à l'augmentation de l'expression de T $\beta$ RII ([Fralix et al., 2003](#)) et augmente l'intensité et la durée d'activation des voies de signalisation p38MAPK, SMAD2 et SMAD3 en réponse au TGF $\beta$  ([Nikolaos](#)

Patsoukis *et al.*, présentation orale au 53e congrès de American society and Hematology, 2011). Dans les macrophages, le TGF $\beta$  inhibe dans un premier temps l'activation de Rap1 et permet ainsi leur migration via un mécanisme impliquant RhoA. En revanche, lors d'un signal TGF $\beta$  plus long, la synthèse d'AMPc permet l'activation de Rap1 qui inhibe alors RhoA et arrête la migration des macrophages (Moon *et al.*, 2013).

Enfin, Rap1 est aussi impliquée dans l'EMT. En effet, l'inhibition de la petite protéine G Rnd1 dans les MCF10A conduit à l'activation de Rap1, qui inhibe p120-Ras-GAP et conduit finalement à l'activation de Ras et de la voie MAPK et donc à l'induction de l'EMT (Okada *et al.*, 2015).

De façon très intéressante, il a été montré que Rap1 coopère avec la protéine Kidins220, aussi mise en évidence dans le crible, pour activer la voie ERK. En effet, suite à un signal de type neurotrophine (NGF par exemple), la Kidins220 est phosphorylée sur sa tyrosine 1096 et va alors interagir avec le domaine SH2 de CRKL qui peut alors interagir avec C3G via son domaine SH3 et induire Rap1 et la voie ERK (Arévalo *et al.*, 2006) (**Figure 35**).



**Figure 35 : Modèle d'activation de la voie ERK par la Kidins220 et Rap1.**

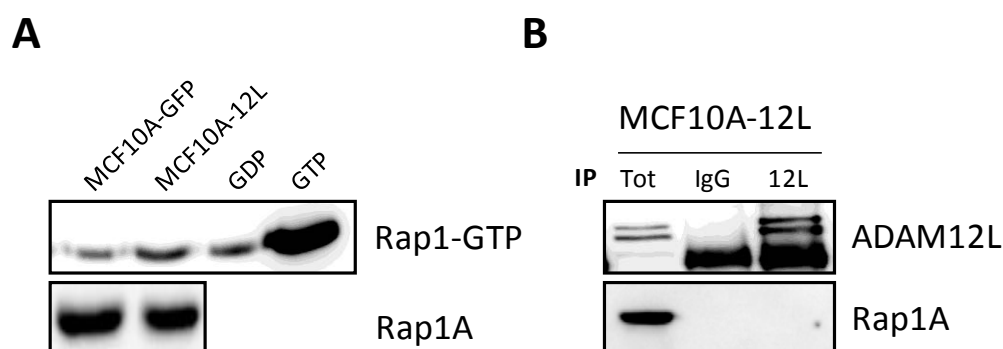
*En l'absence de signal, la Kidins220 interagit avec la kinase CRKL via le domaine SH3 de CRKL. En présence d'un signal de type neurotrophine, la Kidins220 est phosphorylée sur sa tyrosine 1096 et peut alors interagir avec le domaine SH2 de CRKL. Le domaine SH3 ainsi libéré de CRKL interagit avec C3G qui active ensuite Rap1 et la voie ERK.*

### 1.3) Résultats

En raison de l'implication de Rap1 dans l'activation de la voie ERK, dans la signalisation TGF $\beta$  et dans l'EMT, et du fait de sa relocalisation avec ADAM12 dans les radeaux lipidiques suite à un traitement au TGF $\beta$ , nous avons recherché une interaction fonctionnelle avec ADAM12 dans notre modèle d'EMT induite par la surexpression d'ADAM12L.

Dans un premier temps, nous avons recherché si la protéine Rap1 était suractivée dans les cellules MCF10A surexprimant ADAM12L. Pour cela, nous avons utilisé un kit de détection de Rap1-GTP. Comme montré en

**Figure 36**, Rap1 n'est pas activée dans les cellules MCF10A contrôles ou surexprimant ADAM12L puisque l'intensité de la bande est similaire à celle du contrôle négatif GDP. De plus nous n'avons pas pu mettre en évidence une interaction d'ADAM12L avec Rap1A dans les cellules MCF10A-ADAM12L (**Figure 36**).

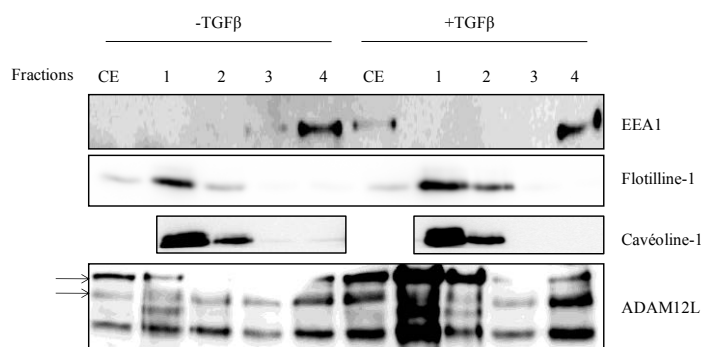


**Figure 36 : ADAM12L n'active pas et n'interagit pas avec Rap1.**

**(A)** Rap1-GTP dans les cellules MCF10A-GFP ou MCF10A-ADAM12L-GFP a été purifiée par pull-down puis les produits ont été analysés par western blot avec un anticorps dirigé contre Rap1. L'incubation des lysats protéiques des cellules MCF10A surexprimant la GFP avec le GDP ou le GTP servent respectivement de contrôle négatif et de contrôle positif. **(B)** Les lysats protéiques des cellules MCF10A surexprimant ADAM12L ont été immunoprécipités avec un anticorps IgG non spécifique ou anti-ADAM12L et les produits d'immunoprécipitation ont été analysés par western blot. Tot : Lysats totaux (20 $\mu$ g).

Nous avons par ailleurs analysé la localisation subcellulaire d'ADAM12L et de Rap1A dans des cellules traitées ou non au TGF $\beta$ . Pour cela, nous avons extrait différentes fractions membranaires à l'aide d'un gradient de sucrose, ce qui nous a permis de séparer les fractions de haute densité (radeaux lipidiques) des fractions de faible densité (membranes non radeaux incluant les membranes intracellulaires comme les endosomes). La purification correcte des différentes fractions membranaires a été vérifiée à l'aide de marqueurs des radeaux lipidiques Flotilline-1 et Cavéoline-1, et du marqueur endosomal EEA1 (**Figure 37**). Les fractions 1 et 2 correspondent aux fractions radeaux lipidiques et les fractions 3 et 4 correspondent aux

fractions non radeaux lipidiques. A l'état basal, ADAM12L est présent dans l'ensemble des fractions dans les MCF10A surexprimant ADAM12L. De façon intéressante, nous avons pu confirmer la relocalisation d'ADAM12L dans les radeaux lipidiques suite à un traitement au TGF $\beta$ . Néanmoins nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de Rap1 dans les fractions analysées alors qu'elle est présente dans la fraction totale (résultats non montrés). L'absence de Rap1 peut être liée à un problème de détection et de nouvelles expériences sur des quantités plus importantes de microdomaines sont nécessaires. Par ailleurs, la localisation de Rap1 n'étant pas exclusivement liée aux membranes, il est nécessaire de compléter cette étude en réalisant des expériences d'immunofluorescence pour analyser la distribution de Rap1 dans les compartiments cellulaires et visualiser éventuellement des modifications de cette distribution dans les cellules traitées au TGF $\beta$ .



**Figure 37 : Localisation d'ADAM12L dans les radeaux lipidiques en réponse au TGF $\beta$ .**

*Les MCF10A surexprimant ADAM12L-GFP ont été traitées au TGF $\beta$  pendant 72H puis les protéines ont été séparées sur un gradient de sucrose par ultracentrifugation. Quatre fractions ont été récupérées et analysées par western blot. Les fractions 1 et 2 correspondent aux membranes de type radeau lipidique et les fractions 3 et 4 correspondent aux autres domaines membranaires.*

En conclusion, nos résultats préliminaires ne montrent pas d'effet de la surexpression d'ADAM12L sur le niveau d'activité de la protéine Rap1 et l'approche par immunoprécipitation (IP) ne permet pas de mettre en évidence une interaction directe. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires pour optimiser la détection de la protéine Rap1A par immunofluorescence et permettre des études de colocalisation dans différents types cellulaires.

## II) Recherche de partenaires pour ADAM12 au cours de l'EMT

Afin de rechercher des partenaires d'ADAM12L potentiellement impliqués dans ses effets sur l'EMT, nous avons réalisé une analyse protéomique globale des protéines co-immunoprécipitées avec ADAM12L dans les cellules MCF10A surexprimant ADAM12L. L'analyse protéomique a été réalisée avec la plate-forme de protéomique du centre de recherche de Québec. Nous avons dans un premier temps mis au point les conditions de co-immunoprécipitation d'ADAM12L à l'aide d'anticorps spécifiques dans notre modèle MCF10A surexprimant ADAM12L. Les résultats montrent bien la présence d'ADAM12L dans l'IP ADAM12L, alors qu'elle est absente dans l'IP non-spécifique IgG de lapin (**Figure 36**).

Les produits immunoprécipités par les anticorps anti-ADAM12L ou des IgG de lapin ont été séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 10% en conditions dénaturantes. Les gels ont été découpés en 7 bandes et chacune d'elles a été soumise à l'analyse protéomique. Brièvement, les protéines sont digérées par la trypsine pour libérer des peptides, lesquels sont séparés par chromatographie liquide en phase reverse (nanoLC) puis analysés par spectrométrie de masse à électrospray (ES MS/MS). La liste des pics de MS/MS est ensuite générée en utilisant le logiciel ProteinPilot avec l'algorithme paragon puis les protéines sont identifiées via le logiciel Mascot.

258 protéines ont été identifiées dans les deux IP parmi lesquelles 94 ont un enrichissement supérieur ou égal à 3 dans les IP ADAM12L comparés aux IP non spécifiques IgG. La liste de ces 94 interactants potentiels est donnée dans le **Tableau 3**. Pour des raisons de lisibilité, seule une partie du tableau est fournie dans le Tableau 3, l'intégralité des données incluant notamment les scores d'IP pour les 94 protéines est fournie en **Annexe 2**.

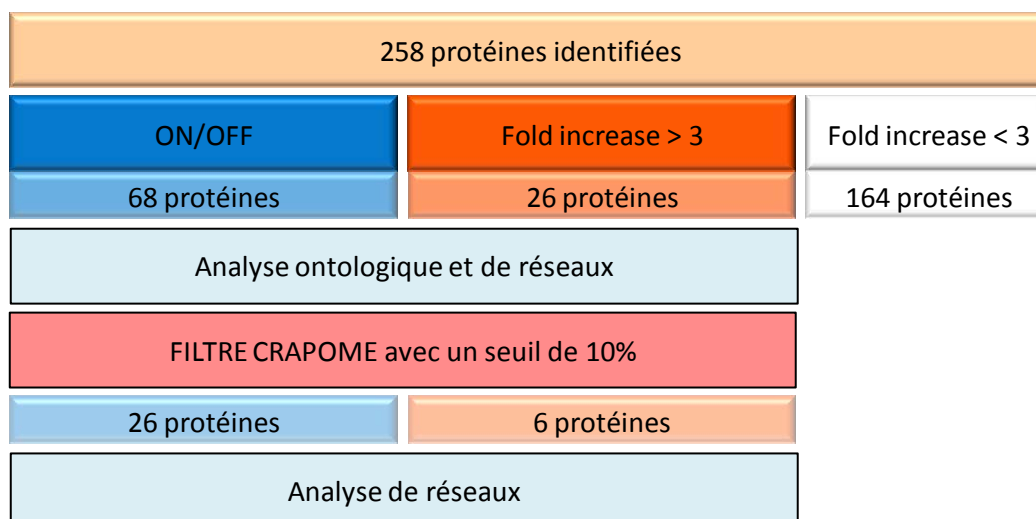
Symbole Gene	Protéines identifiées	Fold Change	Symbole Gene	Protéines identifiées	Fold Change
ADAM12	Metalloprotease-disintegrin 12 transmembrane isoform La	INF	NPEPPS	cDNA FLJ56108, highly similar to Puromycin-sensitive aminopeptidase	INF
Raichu404X	Raichu404X	INF	GMPS	cDNA FLJ57604, highly similar to GMP synthase (glutamine-hydrolyzing)	INF
USP25	Isoform USP25m of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25	INF	HADH	cDNA, FLJ95242, highly similar to Homo sapiens L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	INF
EIF4G1	EIF4G1 protein OS=Homo sapiens GN=EIF4G1 PE=2 SV=1	INF	COPB1	Coatomer subunit beta	INF
TJP2	Tight junction protein 2 (Zona occludens 2)	INF	MCM6	DNA replication licensing factor MCM6	INF
UBC	Polyubiquitin-C (Fragment)	INF	HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1	INF
AP2A1	Isoform B of AP-2 complex subunit alpha-1	INF	NUMA1	Isoform Numa-m of Nuclear mitotic apparatus protein 1	INF
DDX5	cDNA FLJ53366, highly similar to Probable ATP-dependent RNA helicase	INF	MUC19	MUC19 variant 12	INF
RPS14	40S ribosomal protein S14	INF	PDE6H	Retinal cone rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase	INF
TBC1D15	Isoform 2 of TBC1 domain family member 15	INF	VPS35	Vacuolar protein sorting 35 variant (Fragment)	INF
RARS	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	INF	RPS2	40S ribosomal protein S2	INF
DDOST	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit	INF	RPS8	40S ribosomal protein S8	INF
RPS15A	HCG1994130, isoform CRA_a	INF	ITPR3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	INF
PLEKHA5	Pleckstrin homology domain containing, family A member 5, isoform 1	INF	PFKP	Isoform 2 of ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	INF
AFG3L2	AFG3-like protein 2	INF	LONP1	Lon protease homolog, mitochondrial	INF
HADHA	Epididymis tissue sperm binding protein Li 14m	INF	MIA3	Melanoma inhibitory activity protein 3	INF
ATP5O	ATP synthase subunit O, mitochondrial	INF	MYO1B	MYO1B variant protein	INF
F2	cDNA FLJ54622, highly similar to Prothrombin	INF	NFAT5	Nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive, isoform 1	INF
CYTA	CYTSA protein	INF	NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205	INF
LRRFIP1	Isoform 2 of Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	INF	TROPH	Polytrophin	INF
ALDH18A1	Isoform Short of Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	INF	DDX17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	INF
ATAD3A	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	INF	RPS11	40S ribosomal protein S11	15
C4B	Complement C4-B	INF	SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	7,3
RPL14	60S ribosomal protein L14	INF	HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	7,3
AHCY	Adenosylhomocysteinase	INF	EIF4A1	cDNA FLJ78244, highly similar to Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4A	6,9
TJP1	Tight junction protein ZO-1	INF	IQGAI	HCG1991735, isoform CRA_a	6,5
MYO1C	Unconventional myosin-Ic	INF	RPS20	Isoform 2 of 40S ribosomal protein S20	6,5
RPS27	40S ribosomal protein S27	INF	TGFB1	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	5,7
hnrNPU	cDNA FLJ4920 fis, clone BRAMY3011501, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	INF	RPL22	60S ribosomal protein L22	5,7
TARS	cDNA, FLJ96812, highly similar to Homo sapiens threonyl-tRNA synthetase	INF	IGKC	Ig kappa chain C region	4,9
C5	Complement C5	INF	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form	4,5
RPS26	HCG20716	INF	SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (Alpha-1 antiproteinase, antithrombin)	4,5
DDX21	Isoform 2 of Nucleolar RNA helicase 2	INF	TAGLN2	Transgelin-2 (Fragment) O	4,5
PRDX5	Isoform 3 of Peroxiredoxin-5, mitochondrial	INF	ARPC4	Isoform 3 of Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	4,1
ZC3H14	Isoform 4 of Zinc finger CCCH domain-containing protein 14	INF	PABPC1	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1, isoform CRA_b	4,1
DOCK10	sp Q96BY6 DOC10_HUMAN-DECOY Dedicator of cytokinesis protein 10	INF	DRIP4	Dopamine receptor interacting protein 4	4,1
RPL6	60S ribosomal protein L6	INF	N/A	IgG L chain	3,7
AP1G1	cDNA FLJ46199 fis, clone TESTI4007965, highly similar to AP-1 complex subunit 1	INF	ITGB4	Integrin beta	3,7
NUP205	cDNA FLJ50996, highly similar to 60S ribosomal protein L4	INF	RPL27	60S ribosomal protein L27	3,2
PGAM5	Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial	INF	RPL11	Cell growth-inhibiting protein 34	3,2
CIT	Isoform 4 of Citron Rho-interacting kinase	INF	RAB1B	Ras-related protein Rab-1B	3,2
RPS9	Ribosomal protein S9, isoform CRA_a	INF	RPL23	Ribosomal protein L23, isoform CRA_b	3,2
EWSR1	RNA-binding protein EWS	INF	KRT81	Keratin, type II cuticular Hb1	3,2
RPL23A	60S ribosomal protein L23a	INF	PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	3,2
RNPEP	Aminopeptidase B	INF	PRIC295	Peroxisome proliferator activated receptor interacting complex 295	3,2
DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	INF	LMNA	Isoform C of Prelamin-A/C	3,1
CFL1	cDNA FLJ51435, moderately similar to Cofilin-1	INF	TUBA4A	Isoform 2 of Tubulin alpha-4A chain	3

**Tableau 3 : Liste des protéines avec un enrichissement supérieur ou égale à 3 dans les immunoprécipitats ADAM12L comparativement au contrôle.**

La protéine avec le score le plus élevé et qui n'est retrouvée que dans l'IP ADAM12L est ADAM12L elle-même (score = 91) (**Annexe 2**). En deuxième position, on trouve une protéine dénommée Raichu404X (score = 28), une protéine chimérique (Ras and interacting protein chimaeric unit) composée des protéines Ras ou Rap1 et de Raf ainsi que des tags fluorescents CFP et YFP ([Mochizuki et al., 2001](#)). Dans notre cas, il est clair qu'il s'agit en réalité du Tag GFP de notre protéine qui n'a pas pu être identifiée en tant que telle puisque l'analyse protéomique a utilisé uniquement une base de données humaine. Le score de ces deux protéines permet de valider la spécificité de notre analyse.

### 3.1) Analyse protéomique globale

Afin de faciliter l'analyse des résultats et d'enlever une partie du bruit de fond, nous avons arbitrairement analysé les protéines dont le score est au moins 3 fois supérieur dans l'IP ADAM12L comparée à l'IP IgG. On obtient ainsi 94 protéines dont 68 sont totalement absentes de l'IP IgG (**Figure 38**).



**Figure 38 : Analyse protéomique des interactants potentiels d'ADAM12L.**

*Les 258 protéines identifiées dans le crible ont été classées selon leur score. Les protéines classées ON/OFF sont celles qui ont été détectées uniquement dans l'IP ADAM12L. 68 protéines ont un fold increase infini. 26 protéines aussi identifiées dans l'IP non spécifiques ont un fold increase supérieur à 3. L'utilisation d'un filtre CRAPOME a permis d'éliminer le bruit de fond et de diminuer les interactants potentiels à 32 protéines.*

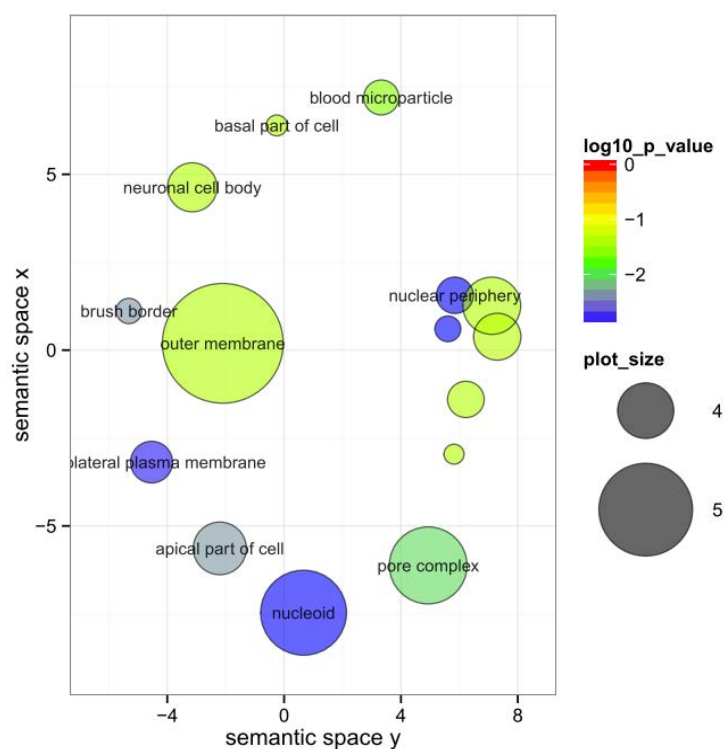
#### *a) Analyse Ontologique*

Pour caractériser les protéines identifiées par le crible, nous avons recherché les termes ontologiques associés à chacune des protéines sur la base des trois niveaux d'annotation GO (Gene ontology) : les processus biologiques, les fonctions moléculaires et la localisation cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé FATIGO, un outil disponible à partir de la suite Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) et qui prend en entrée une liste d'identifiants, annote chacun avec les termes GO et évalue statistiquement la représentativité de ceux-ci par comparaison avec une autre liste (dans notre cas la référence est le génome, soit plus de 20000 identifiants). Les enrichissements sont présentés dans le **Tableau 4** (test hypergéométrique  $p < 0.05$ ). La diversité des annotations ne permettant pas d'identifier des éléments clés, nous avons analysé les regroupements de ces termes en utilisant l'application REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) qui prend en compte l'architecture du graphe des ontologies. En entrée sont soumises les ontologies et leur p-value et le format de sortie est une représentation des enrichissements ontologiques basés sur la valeur statistique et la proximité des annotations. Les représentations graphiques présentées sur les **Figure 39**, **Figure 40** et **Figure 41** ne montrent pas d'enrichissement particulier dans un processus connu pour impliquer ADAM12.

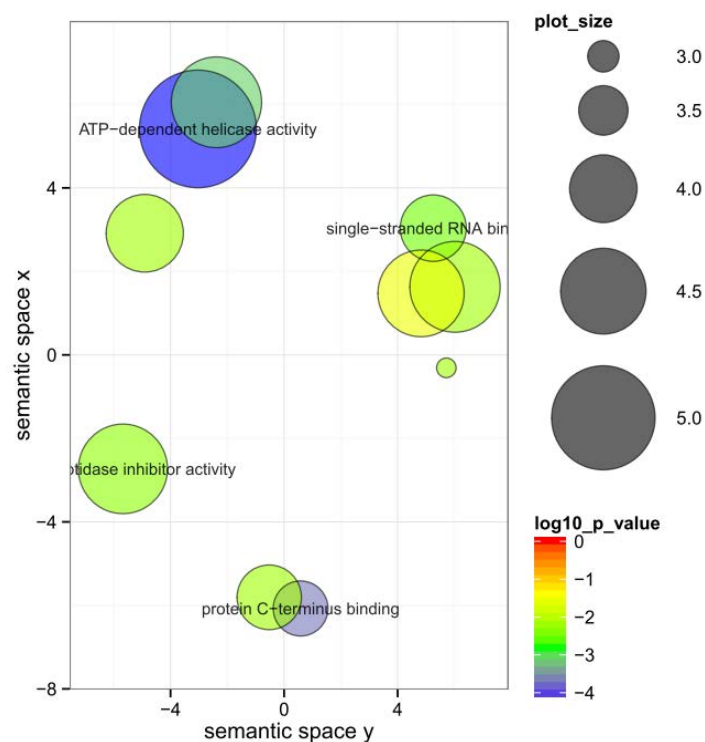
Processus biologiques	Localisation cellulaire
<p>response to oxygen levels(GO:0070482)</p> <p>translational initiation(GO:0006413)</p> <p>protein activation cascade(GO:0072376)</p> <p>Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis(GO:0038096)</p> <p>Fc-gamma receptor signaling pathway(GO:0038094)</p> <p>immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway involved in phagocytosis(GO:0006909)</p> <p>phagocytosis(GO:0006909)</p> <p>response to hypoxia(GO:0001666)</p> <p>response to decreased oxygen levels(GO:0036293)</p> <p>Fc receptor mediated stimulatory signaling pathway(GO:0002431)</p> <p>acute inflammatory response(GO:0002526)</p> <p>nuclear-transcribed mRNA poly(A) tail shortening(GO:0000289)</p> <p>complement activation, classical pathway(GO:0006958)</p> <p>nuclear-transcribed mRNA catabolic process, deadenylation-dependent decay(GO:0000288)</p> <p>nuclear-transcribed mRNA catabolic process(GO:0000956)</p> <p>cell cycle G2/M phase transition(GO:0044839)</p> <p>humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin(GO:0002455)</p> <p>energy reserve metabolic process(GO:0006112)</p> <p>G2/M transition of mitotic cell cycle(GO:0000086)</p> <p>regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway(GO:0042058)</p> <p>complement activation(GO:0006956)</p> <p>regulation of ERBB signaling pathway(GO:1901184)</p> <p>positive regulation of type I interferon production(GO:0032481)</p> <p>nucleus organization(GO:0006997)</p> <p>cellular component disassembly involved in execution phase of apoptosis(GO:0006921)</p> <p>alpha-amino acid biosynthetic process(GO:1901607)</p> <p>positive regulation of collagen metabolic process(GO:0010714)</p> <p>positive regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway(GO:0045745)</p> <p>immunoglobulin mediated immune response(GO:0016064)</p> <p>positive regulation of collagen biosynthetic process(GO:0032967)</p> <p>B cell mediated immunity(GO:0019724)</p> <p>mRNA 3'-end processing(GO:0031124)</p> <p>regulation of collagen biosynthetic process(GO:0032965)</p> <p>positive regulation of multicellular organismal metabolic process(GO:0044253)</p> <p>regulation of mitochondrion organization(GO:0010821)</p> <p>type I interferon production(GO:0032606)</p> <p>regulation of type I interferon production(GO:0032479)</p> <p>RNA 3'-end processing(GO:0031123)</p> <p>regulation of collagen metabolic process(GO:0010712)</p> <p>inositol phosphate-mediated signaling(GO:0048016)</p> <p>execution phase of apoptosis(GO:0097194)</p> <p>collagen biosynthetic process(GO:0032964)</p> <p>activation of MAPK activity(GO:0000187)</p> <p>nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay(GO:0000184)</p> <p>virion assembly(GO:0019068)</p> <p>negative regulation of mitochondrion organization(GO:0010823)</p> <p>cellular amino acid biosynthetic process(GO:0008652)</p> <p>regulation of multicellular organismal metabolic process(GO:0044246)</p>	<p>nuclear periphery(GO:0034399)</p> <p>mitochondrial nucleoid(GO:0042645)</p> <p>nucleoid(GO:0009295)</p> <p>basolateral plasma membrane(GO:0016323)</p> <p>brush border(GO:0005903)</p> <p>apical part of cell(GO:0045177)</p> <p>pore complex(GO:0046930)</p> <p>basal plasma membrane(GO:0009925)</p> <p>blood microparticle(GO:0072562)</p> <p>outer membrane(GO:0019867)</p> <p>cytoplasmic stress granule(GO:0010494)</p> <p>cytosolic small ribosomal subunit(GO:0022627)</p> <p>neuronal cell body(GO:0043025)</p> <p>basal part of cell(GO:0045178)</p> <p>organelle outer membrane(GO:0031968)</p> <p>Golgi-associated vesicle membrane(GO:0030660)</p>
	Fonction moléculaire
	<p>ATP-dependent helicase activity(GO:0008026)</p> <p>purine NTP-dependent helicase activity(GO:0070035)</p> <p>protein C-terminus binding(GO:0008022)</p> <p>RNA-dependent ATPase activity(GO:0008186)</p> <p>RNA helicase activity(GO:0003724)</p> <p>single-stranded RNA binding(GO:0003727)</p> <p>peptidase inhibitor activity(GO:0030414)</p> <p>endopeptidase regulator activity(GO:0061135)</p> <p>endopeptidase inhibitor activity(GO:0004866)</p> <p>calmodulin binding(GO:0005516)</p> <p>double-stranded RNA binding(GO:0003725)</p> <p>hydrolase activity, acting on ether bonds(GO:0016801)</p> <p>poly(A) binding(GO:0008143)</p> <p>poly-purine tract binding(GO:0070717)</p> <p>DNA helicase activity(GO:0003678)</p> <p>mRNA binding(GO:0003729)</p> <p>ATP-dependent RNA helicase activity(GO:0004004)</p>

**Tableau 4 : Liste des enrichissements des termes GO selon le processus biologique, la localisation cellulaire et la fonction moléculaire (p-value < 0.05).**

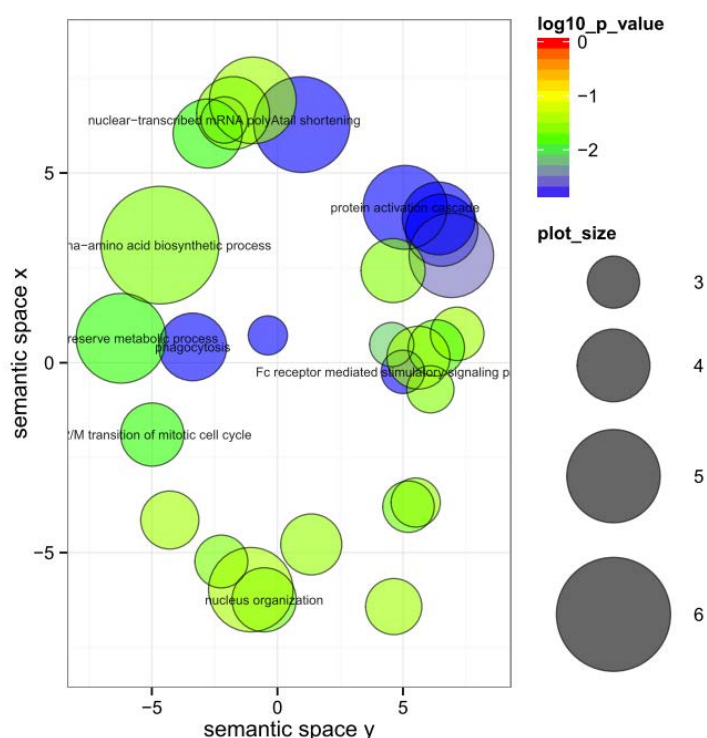




**Figure 39 : Analyse intégrative des annotations ontologiques de type "localisation cellulaire" à l'aide de REVIGO.**



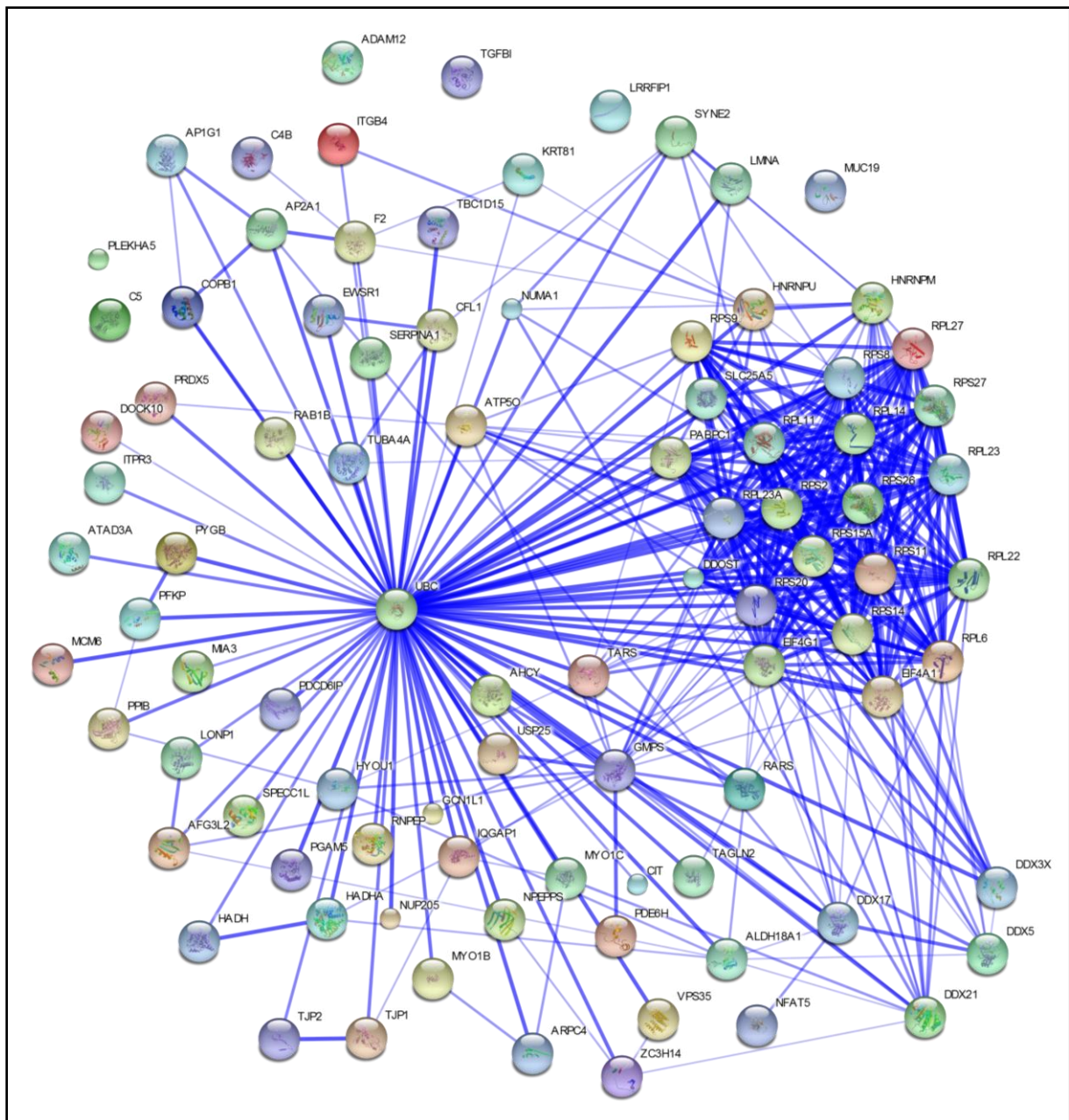
**Figure 40 : Analyse intégrative des annotations ontologiques de type "processus biologique" à l'aide de REVIGO.**



**Figure 41 : Analyse intégrative des annotations ontologiques de type "fonction moléculaire" à l'aide de REVIGO.**

#### *b) Analyse des réseaux d'interaction à l'aide de STRING*

Afin d'approfondir l'analyse protéomique d'ADAM12L, nous avons cherché les relations entre les différentes protéines du crible. Pour cela, nous avons utilisé la base de donnée STRING permettant de créer un réseau protéique sur la base de plusieurs critères comme une interaction protéique physique, une coexpression, ou encore une co-citation dans un même abstract. Dans notre analyse, nous avons choisi de garder l'ensemble des critères sur les 94 protéines avec un enrichissement supérieur à 3. La construction du réseau ne montre aucune connexion entre ADAM12 et une autre protéine (**Figure 42**). On distingue principalement 2 réseaux, l'un est centré sur la **polyubiquitine C** (UBC) tandis que l'autre comprend des protéines impliquées dans la traduction, la plupart étant des composants ribosomaux. Ce type de résultat n'est pas étonnant puisque de nombreuses protéines sont ubiquitinées et interagissent avec la machinerie de traduction. De plus, ce type d'interaction est particulièrement exagéré dans un modèle de surexpression d'une protéine.



**Figure 42 : Réseau d'interaction des 94 protéines sélectionnées.**

Ces analyses nous ont amenés à reconsidérer nos données et nous avons utilisé l'outil CRAPOME qui permet d'éliminer les protéines souvent retrouvées dans les analyses protéomiques. CRAPOME est à la fois une base de données répertoriant 421 analyses protéomiques et un outil bioinformatique permettant de filtrer les données protéomiques de façon automatique, qui sont soit des contaminants, soit des protéines d'interaction non spécifiques et qui ne présentent donc que peu d'intérêt. Nous avons décidé arbitrairement d'éliminer les protéines qui étaient citées dans plus de 10% des analyses protéomiques. Ainsi, on obtient 32 protéines listées dans le **Tableau 5**.

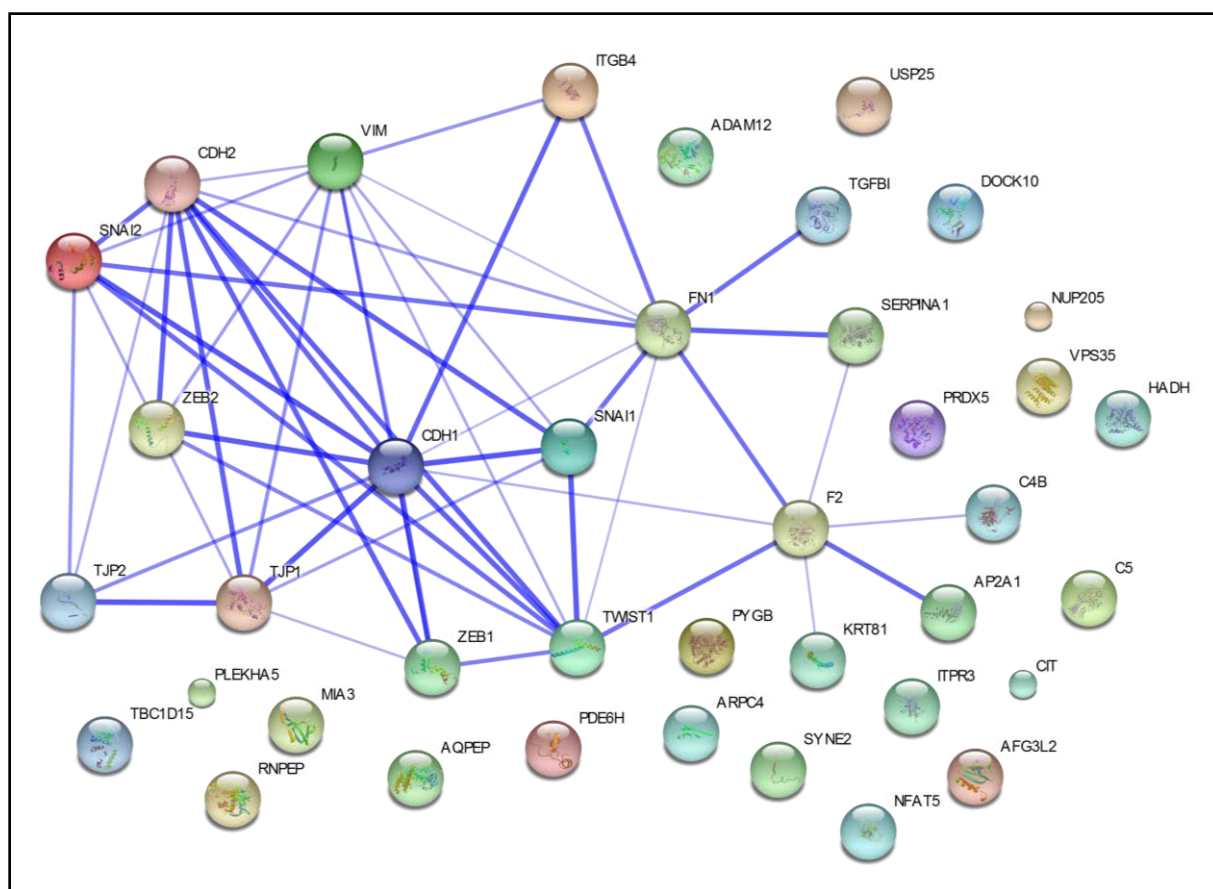
Symbole Gene	Fold Change	IP Adam12L	IP IgG	Score Crapome /411
ADAM12	INF	91	0	0
USP25	INF	27	0	0
PDE6H	INF	3	0	0
ITGB4	3,7	9	2	0
DOCK10	INF	5	0	1
TGFB1	5,7	14	2	1
SERPINA1	4,5	11	2	2
AP1G1	INF	4	0	4
NFAT5	INF	2	0	5
CIT	INF	4	0	9
RNPEP	INF	3	0	10
TROPH	INF	2	0	10
PLEKHA5	INF	10	0	13
ITPR3	INF	2	0	15
F2	INF	8	0	16
MIA3	INF	2	0	16
PYGB	4,5	28	5	19
C5	INF	5	0	20
AFG3L2	INF	9	0	21
TBC1D15	INF	11	0	23
AP2A1	INF	15	0	24
PRDX5	INF	5	0	26
HADH	INF	3	0	27
TJP2	INF	23	0	32
AQPEP	INF	3	0	34
TJP1	INF	6	0	35
VPS35	INF	3	0	35
NUP205	INF	4	0	37
NUP205	INF	2	0	37
ARPC4	4,1	10	2	39
C4B	INF	7	0	40
KRT81	3,2	4	1	40

**Tableau 5 : Liste des protéines de notre crible ayant un score CRAPOME inférieur à 10%.**

Ce filtre nous a conduits à éliminer 62 protéines de notre crible (soit environ 2 tiers) et par conséquent, la reconstruction d'un réseau entre les 32 protéines restantes nécessite une approche différente. En effet, si le réseau est beaucoup plus lisible, en contrepartie, très peu de protéines sont référencées pour des interactions dans la base de données STRING (**Figure 43**).



l'expression d'ADAM12L, soit la N-cadhérine (CDH2), la Vimentine (Vim), Snail, Twist, Zeb et la Fibronectine (FN1) ou anticorrélés pour la E-cadhérine (CDH1) (**Figure 44**). Comme attendu, les protéines ZO1 et ZO2 s'intègrent fortement dans le réseau EMT avec notamment une interaction physique entre ZO1 et la Vimentine et entre ZO2 et Snail2. De plus, la Fibronectine interagit physiquement avec la Prothrombine, SERPINA1 ainsi que **TGFBI** (TGFβ-induced). Cette dernière est une protéine de la MEC dont l'expression est induite par le TGFβ. Enfin, l'intégrine β4 est aussi reliée au réseau EMT via une interaction physique avec la Vimentine et une cocitation avec la Fibronectine.



**Figure 44 : Réseau d'interaction des protéines sélectionnées avec l'ajout de marqueurs majeurs de l'EMT (E-cadhérine (CDH1), N-cadhérine (CDH2) et Vimentine (Vim), SNAIL (SNAI1), SNAIL2 (SNAI2), ZEB1/2, TWIST1 et la Fibronectine (FN1) ).**

### c) Coexpression des protéines criblées

Afin d'approfondir les relations entre les protéines obtenues dans le crible, nous avons recherché si elles étaient co-exprimées. Pour cela, nous avons utilisé la base de données Cell



Miner, qui répertorie l'expression de tous les gènes sur 60 lignées cancéreuses provenant de plusieurs organes (<http://discover.nci.nih.gov/cellminer/>). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 6**.

	ADAM12	USP25	PDE6H	ITGB4	DOCK10	TGFB1	SERPINA1	NEFAT5	CIT	RNPEP	PLEKHA5	ITPR3	F2	MIA3	PGCB	C5
ADAM12	-0.175	-0.035	-0.174	-0.238	-0.416	-0.12	0.164	0.219	-0.199	-0.072	-0.145	-0.281	-0.169	-0.119	-0.089	-0.172
USP25	-0.117	-0.035	-0.035	0.238	-0.416	-0.12	0.164	0.219	-0.199	-0.072	-0.145	-0.281	-0.169	-0.119	-0.089	-0.172
PDE6H	-0.159	0.236	0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174	-0.174
ITGB4	<b>0.347</b>	<b>-0.418</b>	<b>-0.13</b>	<b>-0.592</b>	<b>-0.22</b>	<b>-0.016</b>	<b>0.035</b>	<b>0.224</b>	<b>0.02</b>	<b>0.19</b>	<b>-0.184</b>	<b>-0.184</b>	<b>-0.184</b>	<b>-0.184</b>	<b>-0.184</b>	<b>-0.184</b>
DOCK10	<b>0.661</b>	<b>-0.12</b>	<b>-0.087</b>	<b>-0.129</b>	<b>-0.183</b>	<b>-0.248</b>	<b>-0.164</b>	<b>-0.164</b>	<b>-0.164</b>	<b>-0.164</b>	<b>-0.164</b>	<b>-0.164</b>	<b>-0.164</b>	<b>-0.164</b>	<b>-0.164</b>	<b>-0.164</b>
TGFB1	0.012	0.164	0.129	0.087	0.193	-0.144	-0.248	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164
SERPINA1	0.012	0.164	0.129	0.087	0.193	-0.144	-0.248	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164
NEFAT5	-0.248	0.219	0.061	0.193	-0.144	-0.248	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164
CIT	-0.164	-0.199	-0.054	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164	-0.164
RNPEP	-0.053	-0.012	0.165	0.161	-0.101	-0.041	0.123	0.234	0.02	0.19	-0.184	-0.184	-0.184	-0.184	-0.184	-0.184
PLEKHA5	-0.164	-0.221	0.175	-0.287	0.296	0.007	-0.009	0.149	0.02	0.19	-0.184	-0.184	-0.184	-0.184	-0.184	-0.184
ITPR3	-0.081	-0.028	0.093	0.209	0.027	0.047	0.159	0.167	0.212	0.19	-0.184	-0.184	-0.184	-0.184	-0.184	-0.184
F2	0.085	0.159	0.013	0.066	-0.183	-0.206	-0.054	-0.02	-0.345	0.06	-0.163	-0.163	-0.163	-0.163	-0.163	-0.163
MIA3	0.127	-0.118	-0.151	-0.248	<b>0.343</b>	-0.062	0.121	0.049	<b>0.541</b>	0.198	0.168	-0.019	-0.331	0.072	-0.173	0.072
PGCB	0.081	-0.18	-0.008	-0.178	<b>0.411</b>	-0.178	-0.085	0.123	<b>0.541</b>	0.154	<b>0.437</b>	0.225	-0.091	-0.173	-0.173	-0.173
C5	0.121	-0.11	0.165	0.308	-0.087	0.219	-0.082	0.123	-0.07	0.056	0.163	0.076	-0.115	0.081	0.081	0.081
AFGL2	-0.427	-0.427	-0.001	-0.176	-0.293	0.066	-0.087	-0.026	0.319	0.178	<b>0.343</b>	0.088	-0.258	-0.112	0.112	-0.306
TBC1D15	-0.287	-0.074	-0.174	-0.103	0.159	-0.43	0.029	0.049	0.266	0.065	0.15	-0.053	-0.422	0.207	-0.01	-0.129
AP2A1	<b>0.336</b>	-0.088	0.04	-0.051	0.11	-0.146	-0.052	-0.069	-0.09	-0.052	-0.111	-0.151	-0.148	0.112	0.023	0.247
PRDX5	-0.178	0.17	0.043	0.056	-0.17	-0.058	0.053	0.2	-0.156	0.006	-0.038	-0.024	-0.113	-0.113	-0.055	-0.055
HADH	<b>0.406</b>	0.113	0.106	0.114	-0.237	-0.514	-0.069	-0.126	-0.043	0.015	-0.178	-0.081	-0.32	0.027	-0.132	-0.021
TUP2	-0.048	0.323	0.001	0.315	-0.306	-0.12	-0.307	0.137	-0.027	0.059	-0.081	0.306	-0.32	0.027	-0.132	-0.021
AOPEP	-0.088	0.035	-0.039	0.044	0.025	-0.074	-0.033	0.122	-0.024	0.115	0.109	0.02	-0.057	0.073	0.032	-0.002
TUP1	0.114	0.258	-0.034	<b>0.39</b>	-0.312	-0.183	0.038	0.237	0.046	0.13	0.146	-0.176	-0.031	0.044	0.011	-0.082
VPS35	-0.284	0.27	-0.113	0.224	-0.287	-0.183	0.038	0.237	0.046	0.13	0.146	-0.176	-0.031	0.044	0.011	-0.082
NUP205	<b>-0.353</b>	-0.239	-0.209	<b>-0.384</b>	0.045	<b>-0.38</b>	0.156	0.053	0.246	-0.048	0.145	0.11	-0.253	0.06	0.098	-0.091
ARPC4	0.209	-0.265	-0.011	-0.164	0.169	-0.034	0.118	-0.063	0.073	0.246	-0.048	0.145	0.11	-0.253	0.06	0.098
CAB	0.33	0.123	0.018	0.039	-0.011	0.201	-0.084	-0.05	-0.3	0.223	0.223	-0.021	0.245	0.11	-0.109	0.109
KRT81	0.126	0.009	-0.029	-0.288	-0.06	0.25	-0.065	-0.176	-0.146	-0.007	-0.236	-0.042	0.248	0.044	0.054	<b>0.336</b>
CDH1	<b>-0.388</b>	0.161	0.316	<b>-0.421</b>	-0.309	-0.373	-0.048	0.125	-0.096	-0.422	<b>-0.426</b>	-0.175	-0.198	-0.149	-0.031	-0.279
CDH2	<b>-0.579</b>	-0.027	-0.187	-0.239	-0.321	<b>-0.554</b>	-0.077	-0.216	-0.021	<b>-0.446</b>	-0.044	-0.097	-0.149	-0.031	-0.037	-0.062
Vim	<b>0.523</b>	0.325	0.288	<b>0.464</b>	<b>0.561</b>	<b>0.554</b>	0.034	0.089	0.355	<b>0.355</b>	0.262	0.238	0.088	0.133	<b>0.357</b>	-0.123
	MEF12	TBC1D15	AP2A1	PRDX5	HADH	TUP2	AOPEP	TUP1	VPS35	NUP205	ARPC4	CAB	KRT81	CDH1	CDH2	Vim
ADAM12	-0.427	-0.297	-0.256	-0.179	-0.406	-0.348	-0.035	0.134	-0.354	-0.353	-0.206	0.33	0.176	-0.268	-0.279	0.232
USP25	-0.001	-0.074	-0.089	0.17	0.133	0.233	0.035	0.239	0.27	-0.113	-0.209	0.123	0.009	-0.181	-0.079	-0.232
PDE6H	-0.178	0.14	0.04	0.043	0.106	0.001	-0.039	-0.034	0.254	-0.354	-0.164	0.039	0.289	-0.451	-0.239	-0.464
ITGB4	-0.293	-0.103	-0.051	0.206	0.114	0.315	0.044	0.39	0.254	-0.354	-0.164	0.039	0.289	-0.451	-0.239	-0.464
DOCK10	0.098	0.159	0.1	-0.17	-0.237	-0.306	0.035	-0.312	-0.297	0.045	0.189	-0.071	-0.05	-0.309	0.237	0.657
TGFB1	-0.427	-0.43	0.146	-0.399	-0.514	0.12	-0.074	0.033	-0.433	-0.358	-0.054	0.201	0.25	-0.073	0.644	0.14
SERPINA1	0.122	0.029	-0.052	0.053	-0.069	0.417	0.033	0.043	-0.069	0.116	-0.084	0.201	0.25	-0.073	0.644	0.14
NEFAT5	-0.026	0.049	-0.059	0.2	-0.126	0.137	0.122	0.444	0.237	-0.053	-0.063	0.116	-0.084	0.201	0.25	-0.073
CIT	0.319	-0.043	-0.199	-0.199	-0.043	-0.027	-0.024	0.046	0.013	-0.063	-0.073	-0.434	-0.176	-0.126	-0.031	0.353
RNPEP	-0.052	0.078	-0.052	0.006	0.015	0.059	0.115	0.277	-0.146	-0.048	-0.054	-0.026	-0.007	0.422	-0.346	-0.262
PLEKHA5	0.343	0.15	-0.111	-0.038	-0.178	-0.081	0.109	0.137	-0.178	0.145	0.102	-0.3	-0.176	0.175	-0.344	0.238
ITPR3	0.098	-0.053	0.151	-0.034	0.305	0.02	0.206	-0.031	-0.031	0.11	-0.07	-0.021	0.138	-0.042	0.138	-0.02
F2	-0.268	-0.422	-0.148	0.177	-0.32	-0.071	-0.057	0.132	0.044	-0.233	-0.514	0.215	0.248	-0.149	0.239	0.098
MIA3	0.037	0.207	0.112	-0.113	0.027	-0.532	0.073	-0.444	0.011	0.06	0.152	0.11	-0.044	-0.051	-0.018	0.138
PGCB	0.112	-0.01	0.023	-0.05	-0.131	-0.068	0.032	-0.032	-0.21	0.099	0.084	-0.109	0.044	-0.059	0.037	0.037
C5	-0.306	-0.129	0.247	-0.057	0.098	0.111	-0.047	-0.255	0.164	0.158	0.449	-0.126	-0.284	0.136	-0.284	-0.231
AFGL2	0.247	0.247	-0.152	-0.152	-0.242	-0.242	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035
TBC1D15	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
AP2A1	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
PRDX5	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
HADH	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
TUP2	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
AOPEP	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
TUP1	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
VPS35	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
NUP205	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
ARPC4	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
CAB	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
KRT81	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
CDH1	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
CDH2	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057
Vim	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057	-0.057

**Tableau 6 : Tableau de corrélation des 32 protéines du crible, dans 60 lignées cancéreuses provenant de plusieurs organes.**

*Les marqueurs de l'EMT E-cadhérine (CDH1), N-cadhérine (CDH2) et Vimentine (Vim) ont été ajoutés comme contrôle interne à l'analyse. En Bleu ou Rouge :  $p < 0.05$ . En noir : NS.*

La plus forte corrélation d'expression d'ADAM12 est avec le TGFBI ( $R = 0,661$ ,  $p < 0.05$ ). On observe de plus une corrélation positive d'ADAM12 avec AP2A1 ( $R = 0.336$ ,  $p < 0.05$ ) et DOCK10 ( $R = 0.347$ ,  $p < 0.05$ ) et une corrélation négative avec AFG3L2 ( $R = -0.427$ ,  $p < 0.05$ ), HADH ( $R = -0.406$ ,  $p < 0.05$ ) et NUP205 ( $R = -0.353$ ,  $p < 0.05$ ). Ces protéines ne semblent pas fonctionnellement connectées.

Nous avons précédemment montré la corrélation de l'expression d'ADAM12L avec celle des marqueurs mésenchymateux N-cadhérine et Vimentine dans 20 lignées de cancers mammaires (voir Article, Fig1B). En accord avec ces résultats, l'expression d'ADAM12 est aussi corrélée à ces marqueurs dans la base de données Cell Miner regroupant 60 lignées tumorales provenant de plusieurs organes. De façon intéressante, l'expression de TGFBI corréle très fortement avec celle des marqueurs de l'EMT, E-cadhérine, N-cadhérine et Vimentine, avec des coefficients de corrélation proches de ceux partagés par ADAM12 et ces mêmes protéines. Il est à noter que l'expression des variants d'ADAM12L et d'ADAM12S n'est pas disponible dans cette base de données et représente donc l'expression des deux variants.

Sur la base des analyses de réseaux et de co-expression, notre intérêt s'est porté d'une part sur le TGFBI dont l'expression est fortement corrélée à celle d'ADAM12 et des marqueurs de l'EMT, et qui est impliquée dans la signalisation du TGF $\beta$ . D'autre part, l'immunoprécipitation simultanée par un anticorps anti-ADAM12L de deux composants des jonctions serrées, ZO-1 et ZO-2, qui sont désassemblées au cours de l'EMT valide l'intérêt de ces protéines vis à vis de la fonctionnalité d'ADAM12L.

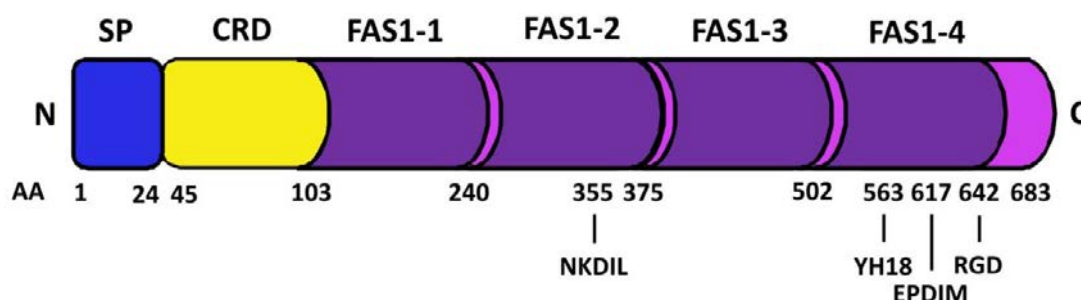
### **3.2) Interactions physiques et fonctionnelles entre les protéines ADAM12L et le TGFBI**

#### ***a) TGFBI : une protéine matricielle induite par le TGF $\beta$***

Le TGFBI (ou  $\beta$ ig-H3 pour TGF $\beta$  induced gene - clone H3) est une protéine de la matrice extracellulaire qui a été clonée pour la première fois en 1992 dans les cellules A549 traitées au TGF $\beta$  pendant 2 jours (Skonier et al., 1992). Sa structure se compose d'un signal de sécrétion en position N-terminale, d'un domaine riche en cystéine, de quatre domaines fascicline-1 (FAS1), d'un domaine RGD de liaison aux intégrines et des motifs NKDIL, YH18 et EPDIM impliqués dans l'adhésion (**Figure 45**). Le domaine FAS1 est un domaine



extracellulaire commun aux plantes, aux animaux et aux bactéries qui joue un rôle dans les phénomènes d'adhésion cellulaire.



**Figure 45 : Structure du TGFBI.**

(Schéma de Ween et al., 2012)

Il a été montré que le TGF $\beta$  induit l'expression du TGFBI dans de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les chondrocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales de la cornée ainsi que plusieurs types de cellules cancéreuses.

Dans la matrice, le TGFBI fonctionne en liant les protéines de la matrice extracellulaire les unes aux autres, facilitant ainsi les interactions de la cellule avec le collagène. Le TGFBI peut se lier aux collagènes I, II, IV et VI, aux protéoglycanes comme le biglycan et la décorine, la fibronectine et plusieurs intégrines, ses seuls récepteurs de surface connus (Ween et al., 2012). Comme le TGF $\beta$ , le TGFBI exerce des effets ambivalents au cours de la progression tumorale, il peut être un oncogène ou un suppresseur de tumeur selon le contexte cellulaire et microenvironnemental. Une liste des activités pro-tumorales et anti-tumorales du TGFBI est donnée dans le **Tableau 7**. Le TGFBI est principalement une protéine d'adhésion et de migration. Ainsi, à travers ses interactions avec les intégrines ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha 6\beta 4$  et  $\alpha 7\beta 1$ ), le TGFBI peut permettre aux cellules d'adhérer à la matrice extracellulaires et favorise ou au contraire diminue la migration des cellules (Lee et al., 2007; Thapa et al., 2007; Ween et al., 2012; Wen et al., 2011; WEN et al., 2011). Outre ses activités promotrices d'adhésion et/ou de migration, des propriétés promotrices et inhibitrices de la prolifération cellulaire et de l'apoptose ont été mises en évidence (Irigoyen et al., 2010; Januchowski et al., 2014; Kim et al., 2003; Shin et al., 2012; WEN et al., 2011) montrant ainsi la complexité d'action et le rôle pléiotropique de cette protéine.

Table 1. Studies reporting a tumor suppressor role for $\beta$ ig-H3.		Table 2. Studies reporting a tumor-promoting role for $\beta$ ig-H3.	
Cell Type	Observation	Cell type	Observation
CHO cells	$\beta$ ig-H3 inhibits cell attachment <i>in vitro</i> and suppresses the growth of CHO tumor cells in nude mice	Lung adenocarcinoma	$\beta$ ig-H3 is overexpressed in lung cancer Recombinant $\beta$ ig-H3 stimulates proliferation and cell adhesion of A549 cells
HeLa cells	RGD peptides released from $\beta$ ig-H3 mediate apoptosis of HeLa tumor cells	Oesophageal adenocarcinoma	$\beta$ ig-H3 is up-regulated in oesophageal adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma tissues and cell lines tissue
Bronchial epithelial cells	$\beta$ ig-H3 overexpression suppresses tumorigenicity in radiation-induced tumorigenic human bronchial epithelial cells Loss of $\beta$ ig-H3 expression is associated with the tumorigenic phenotype in asbestos-treated bronchial epithelial cells $\beta$ ig-H3 gene down-regulation is involved in heavy-ion radiation-induced tumorigenesis of human bronchial epithelial cells Loss of $\beta$ ig-H3 protein is frequent in primary lung carcinoma and related to tumorigenic phenotype in lung cancer cells Promoter methylation contributes to promoter silencing of the $\beta$ ig-H3 gene in human lung cancer cells	Pancreatic cancer	$\beta$ ig-H3 expression is increased in pancreatic cancer cell lines and tissues
Lung adenocarcinoma	$\beta$ ig-H3 is down-regulated in radiation-induced thymic lymphoma model in BALB/c mice $\beta$ ig-H3 overexpression in H522 lung carcinoma cells reduces motility <i>in vitro</i> and metastasis <i>in vivo</i> RGD $\beta$ ig-H3 peptides mediate apoptosis of H1299 lung carcinoma cells	Oral squamous cell carcinoma	$\beta$ ig-H3 expression is increased in oral squamous cell carcinoma tissues $\beta$ ig-H3 promotes cell adhesion of human astrocytoma cells <i>in vitro</i> via interactions with $\alpha$ 6 $\beta$ 4 integrin
Mesothelioma cell lines	$\beta$ ig-H3 knockdown increases proliferation and anchorage independent growth of mesothelioma cell lines	Brain tumors	$\beta$ ig-H3 expression is elevated in glioblastoma multiforme tissues Knockdown of $\beta$ ig-H3 inhibits glioma cell invasion and MMP secretion $\beta$ ig-H3 knockdown reduced invasion of 7721 cells
Breast carcinoma	$\beta$ ig-H3 protein expression is reduced in <i>in situ</i> ductal carcinoma and breast carcinoma tissues, compared to benign tissues $\beta$ ig-H3 overexpression in MCF-7 cells reduces motility <i>in vitro</i> and metastasis <i>in vivo</i>	Hepatocellular carcinoma	$\beta$ ig-H3 interacts with $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin to promote adhesion and invasion of 7721 cells $\beta$ ig-H3 expression is elevated in human colon carcinoma tissues
Neuroblastoma	$\beta$ ig-H3 significantly reduces proliferation and invasion of neuroblastoma cell <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Colon carcinoma	Overexpression of $\beta$ ig-H3 promotes extravasation and enhances metastasis of colon cancer cells
Osteosarcoma	C-terminal fragment of $\beta$ ig-H3 is required for apoptosis in human osteosarcoma cells	Renal cell carcinoma	$\beta$ ig-H3 is up-regulated in clear cell renal carcinoma $\beta$ ig-H3 expression is increased in metastatic renal cell carcinoma $\beta$ ig-H3 suppression leads to a chemoresistant phenotype
Hepatoma	RGD $\beta$ ig-H3 peptides mediate apoptosis of Hep3B hepatoma cells	Ovarian carcinoma	Recombinant $\beta$ ig-H3 promotes motility and invasion of OVCAR-5 and SKOV3 cells Recombinant $\beta$ ig-H3 promotes adhesion of OVCAR-3, OVCAR-5 and SKOV3 cells
Knockout mice	$\beta$ ig-H3 knockout mice are prone to spontaneous tumors $\beta$ ig-H3 silencing and promoter hypermethylation is a frequent occurrence in ovarian cancer cell lines and ovarian cancer tissues		
Ovarian carcinoma	$\beta$ ig-H3 is down-regulated in serous ovarian carcinoma and borderline serous ovarian tumors $\beta$ ig-H3 induces apoptosis in serous ovarian carcinoma cell lines		

**Tableau 7 : Liste des effets suppresseurs de tumeur et oncogènes du TGFBI.**  
(Tableaux de Ween et al., 2012)

## b) Résultats

La relation étroite entre le TGFBI, le TGF $\beta$ , ADAM12L et les marqueurs de l'EMT font du TGFBI une cible particulièrement intéressante. De plus, le TGFBI n'a été retrouvée que dans une seule analyse protéomique sur 411 d'après la base de données CRAPOME, ce qui renforce la spécificité d'interaction avec ADAM12L.

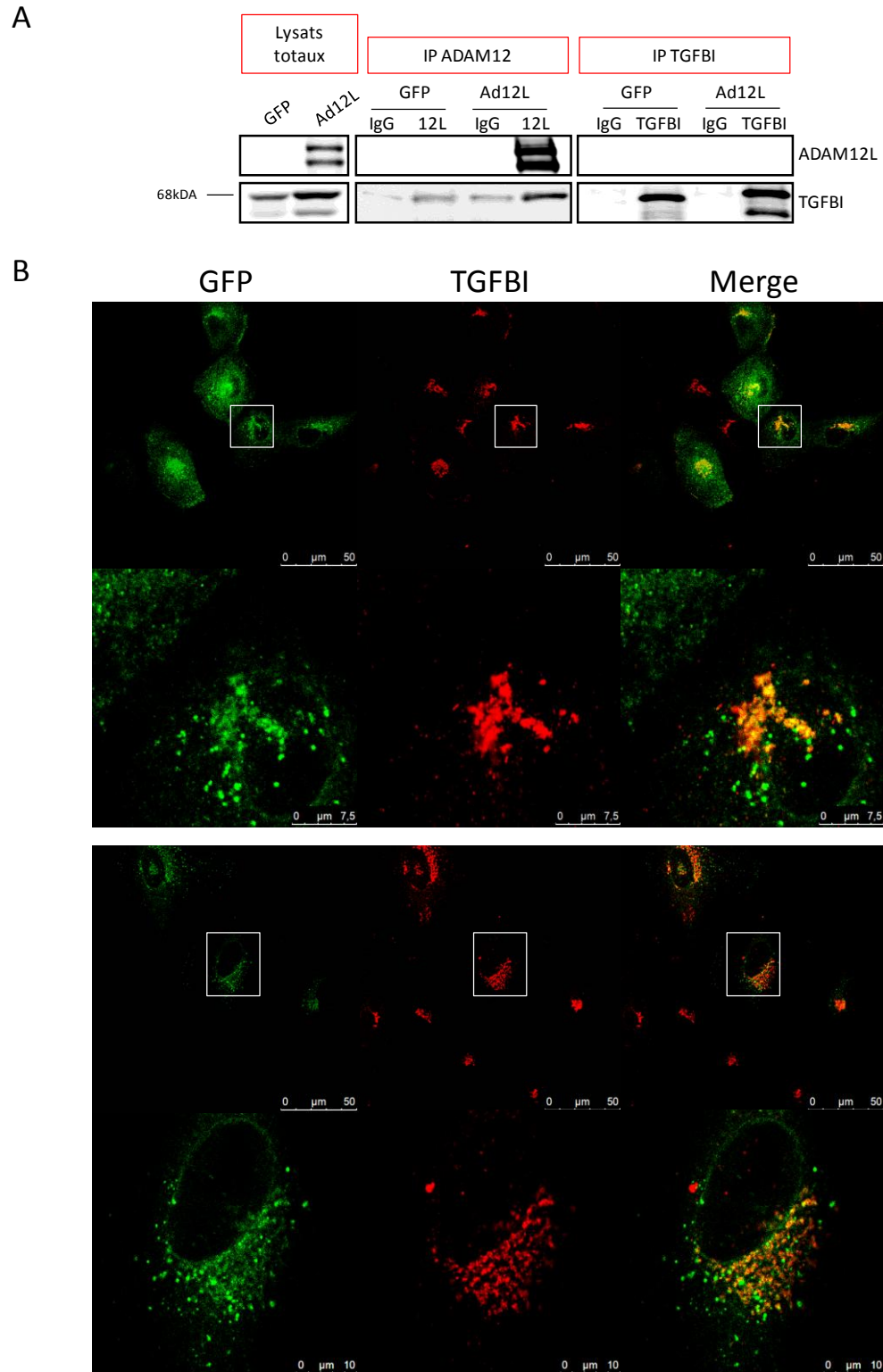
L'analyse par Western blot de l'expression du TGFBI dans les cellules MCF10A surexprimant la GFP ou ADAM12L-GFP montre la présence de deux bandes, l'une correspond au poids moléculaire attendu de 68 kDa et l'autre bande est aux alentours de 55-60kDa. Cette seconde bande pourrait correspondre à la protéine déletée de son peptide contenant le domaine RGD, clivé dans la matrice extracellulaire comme cela a pu être montré par Kim *et al* (Kim et al., 2003).

De façon intéressante, l'expression totale du TGFBI est plus forte dans les cellules MCF10A surexprimant ADAM12L comparée aux cellules contrôles confirmant l'association de leur expression dans notre modèle et suggérant un effet direct ou indirect d'ADAM12L sur l'expression du TGFBI (**Figure 46A**). Nous n'avons pas réussi à détecter ADAM12L dans les IP réalisées avec les anticorps anti-TGFBI. A l'inverse, les produits d'IP anti-ADAM12L

montrent une bande correspondant au TGFBI. Néanmoins, cette bande est aussi présente dans les contrôles négatifs incluant les IgG non spécifiques et l'IP anti-ADAM12L sur MCF10A-GFP. Il est à noter cependant que cette bande est plus faible en intensité dans les témoins négatifs suggérant une interaction potentielle entre ADAM12L et le TGFBI.

Nous avons aussi réalisé des expériences d'immunolocalisation dans les MCF10A-ADAM12L (**Figure 46B**). Le marquage du TGFBI montre clairement une accumulation dans des structures périnucléaires. On observe une très bonne colocalisation du TGFBI et d'ADAM12L au niveau de ces structures périnucléaires.

L'ensemble de ces résultats suggère une interaction physique d'ADAM12L avec le TGFBI mais qui devra être validée par d'autres approches techniques et dans des modèles d'expression endogène comme les cellules étoilées hépatiques et des cellules tumorales mésenchymateuses. Par ailleurs, la pertinence d'une interaction au niveau des structures périnucléaires reste à être évaluée.



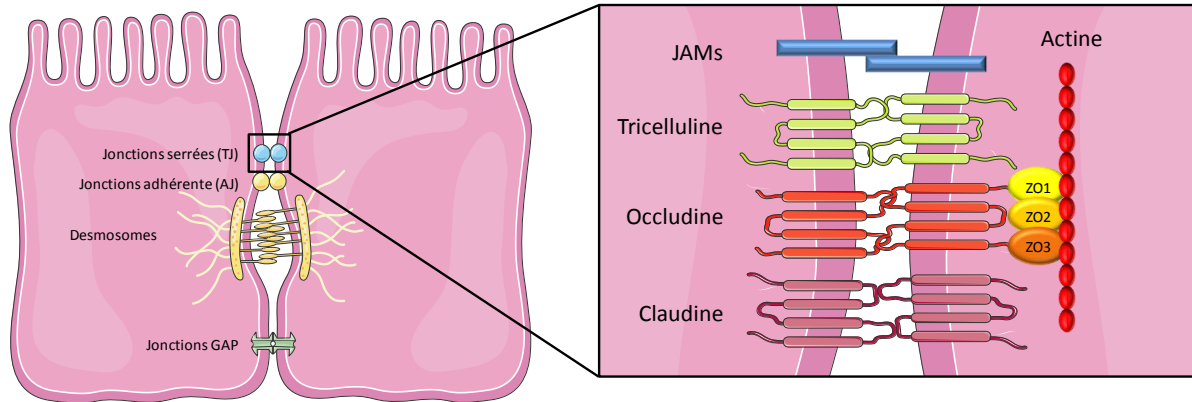
**Figure 46 : Etude de l'interaction en ADAM12L et TGFBI.**

**(A)** Analyse par Western Blot des produits de co-immunoprécipitations anti-ADAM12L , anti-TGFBI sur les MCF10A contrôles (GFP) et les MCF10A surexprimant ADAM12L. **(B)** Analyse de la colocalisation d'ADAM12L-GFP (vert) et du TGFBI (rouge) dans les MCF10A surexprimant ADAM12L.

### 3.3) Interaction d'ADAM12L avec ZO-1 et ZO-2

#### a) ZO1 et ZO2 : composants des jonctions serrées

L'intégrité et l'organisation d'un tissu épithélial est en partie assurée grâce à des jonctions intercellulaires : les jonctions serrées (TJ), jonctions adhérentes (AJ), les desmosomes et les jonctions GAP. Les jonctions serrées régulent le transport d'ions et de molécules entre les cellules (voie paracellulaire en opposition avec la voie transcellulaire) (**Figure 47**).



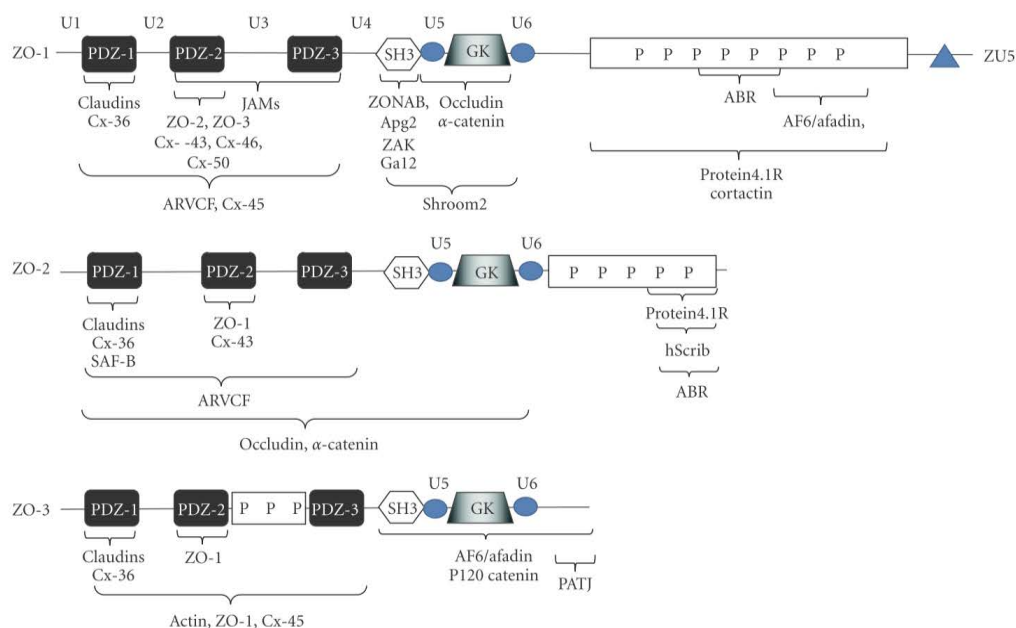
**Figure 47 : Les jonctions serrées.**

*Il existe quatre types de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions GAP. Les jonctions serrées sont constituées de trois éléments protéiques : une protéine transmembranaire telle que les JAMs (Junctional Adhesion Molecules), la Tricelluline, l'Occludine et la Claudine, une protéine d'ancrage périphérique comme ZO1/2/3, MAGI1 et une protéine de régulation associée aux jonctions serrées.*

#### Structure et Fonctions

Les protéines Zona Occludens (ZO), comprenant ZO-1, ZO-2 et ZO-3 sont des protéines d'échafaudage qui recrutent une grande variété de protéines cytoplasmiques au niveau des jonctions intercellulaires. Elles constituent ce qu'on appelle les plaques périphériques des jonctions serrées. Les protéines ZO ont été originellement décrites pour se localiser au niveau des jonctions serrées, mais peuvent également se localiser au niveau des jonctions adhérentes et des jonctions GAP ce qui en fait des protéines plus généralement impliquées dans l'adhésion intercellulaire et la communication.

Les protéines ZO portent plusieurs domaines importants pour maintenir l'organisation structurelle des jonctions intercellulaires mais aussi des domaines impliqués dans la signalisation cellulaire et la transcription. Leur structure se compose de nombreux domaines d'interaction protéique : les domaines PDZ, SH3, GUK (Guanylate kinase), ainsi que des domaines uniques (U) et un domaine riche en proline (**Figure 48**). Ces différents domaines sont responsables des différentes localisations et fonctionnalités des protéines ZO.



**Figure 48 : Structure des protéines ZO et principaux interactants.**  
(Schéma de Bauer et al., 2010)

Les protéines ZO sont des protéines périphériques des jonctions serrées et interagissent directement avec les protéines transmembranaires comme les Claudine, l'Occludine ou encore les JAMs. Par exemple, le domaine PDZ-1 permet l'interaction de ZO-1 avec l'extrémité C-terminale des Claudines. Cette interaction est cruciale pour la formation des jonctions serrées puisqu'elle permet de déterminer où et quand la Claudine se polymérise (Umeda et al., 2006). Les protéines ZO peuvent aussi interagir avec 1) le cytosquelette, de façon directe (filaments d'actine), ou indirecte (ex : Cortactine,  $\alpha$ -caténine, AF6), 2) des protéines de signalisation cellulaire (ex : ZAK pour ZO-1 associated kinase), 3) des protéines des complexes de polarité (ex : Scribble, PATJ pour Protein Associated with tight junctions), 4) des facteurs de transcription comme SAF-B (Scaffold Attachment Factor B), ZONAB (ZO-1 Associated Nucleic Acid Binding Protein), Jun, Fos et C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) (Bauer et al., 2010).

#### ***b) ZO-1/2, EMT et cancer***

Les protéines ZO sont impliquées dans la progression tumorale. En effet, il a été montré qu'elles sont diminuées ou délocalisées dans plusieurs types de carcinomes (Chlenski et al., 2000) et plusieurs études ont montré que la présence de jonctions serrées au sein des cellules tumorales est associée à un faible pouvoir invasif (Hoevel et al., 2002; Ren et al., 1990). Des

mutants de ZO-1 codant uniquement pour le domaine N-terminal (avec les 3 domaines PZD) sont délocalisés dans le cytoplasme de cellules MCDK et induisent un phénotype mésenchymateux (Reichert et al., 2000). Par ailleurs, le sous-type de tumeur mammaire claudin-low présente la signature EMT la plus forte et une faible expression des protéines ZO reliant ainsi clairement l'association négative des jonctions serrées et de ZO-1 avec le phénotype EMT et le potentiel invasif (Taube et al., 2010).

Les jonctions serrées jouent aussi un rôle majeur lors du processus d'intravasation, elles constituent une barrière au niveau des vaisseaux sanguins pour empêcher le passage des cellules tumorales entre les cellules endothéliales. Ainsi, il a été montré que les vaisseaux associés aux tumeurs sont plus perméables que les vaisseaux issus de tissus sains (Utoguchi et al., 1996). NK4, un antagoniste du HGF, inhibe l'effet pro-perméabilisation du HGF ainsi que l'invasion de cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB231 au sein d'un matrigel tapissé de cellules endothéliales HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (Martin et al., 2002). HGF diminue l'expression de ZO-1 et augmente sa phosphorylation sur ses tyrosines, et cet effet est inhibé par le NK4. Les protéines ZO jouent donc un rôle à plusieurs niveaux au cours de la progression tumorale.

### *c) Résultats : interaction entre ADAM12L et ZO-1*

Le lien entre les protéines ZO et la progression tumorale étant établi, l'identification de ZO-1 et de ZO-2 comme potentiels interagissants d'ADAM12L dans un modèle EMT nous a conduits à tenter de valider ces interactions par des approches de co-immunoprécipitation et de co-immunolocalisation.

Comme le montre la **Figure 49**, les analyses par western blot des produits immunoprécipités par l'anticorps anti-ADAM12L permettent de détecter une bande correspondant à ZO-1 dans les MCF10A-ADAM12L. Néanmoins, cette bande apparaît aussi dans l'IP anti-ADAM12L dans les cellules MCF10A-GFP, bien que l'intensité soit nettement plus faible. Ces résultats suggèrent soit une interaction non spécifique de l'anticorps anti-ADAM12L avec ZO-1, soit une interaction d'ADAM12L endogène avec ZO-1. Il est à noter cependant que les cellules contrôles MCF10A-GFP présentent une expression d'ADAM12L endogène très faible et non détectable par western blot (phénotype épithélial).

L'IP anti-ZO-1 montre une bonne efficacité et une bonne spécificité puisque ZO-1 n'est pas détectée dans l'IP réalisée avec des IgG non spécifique de souris. De façon étonnante, la bande ZO-1 est plus intense dans les MCF10A surexprimant ADAM12L par rapport aux

MCF10A contrôles malgré une abondance similaire dans les extraits totaux. Dans ces conditions, aucune bande ADAM12L n'est détectée.

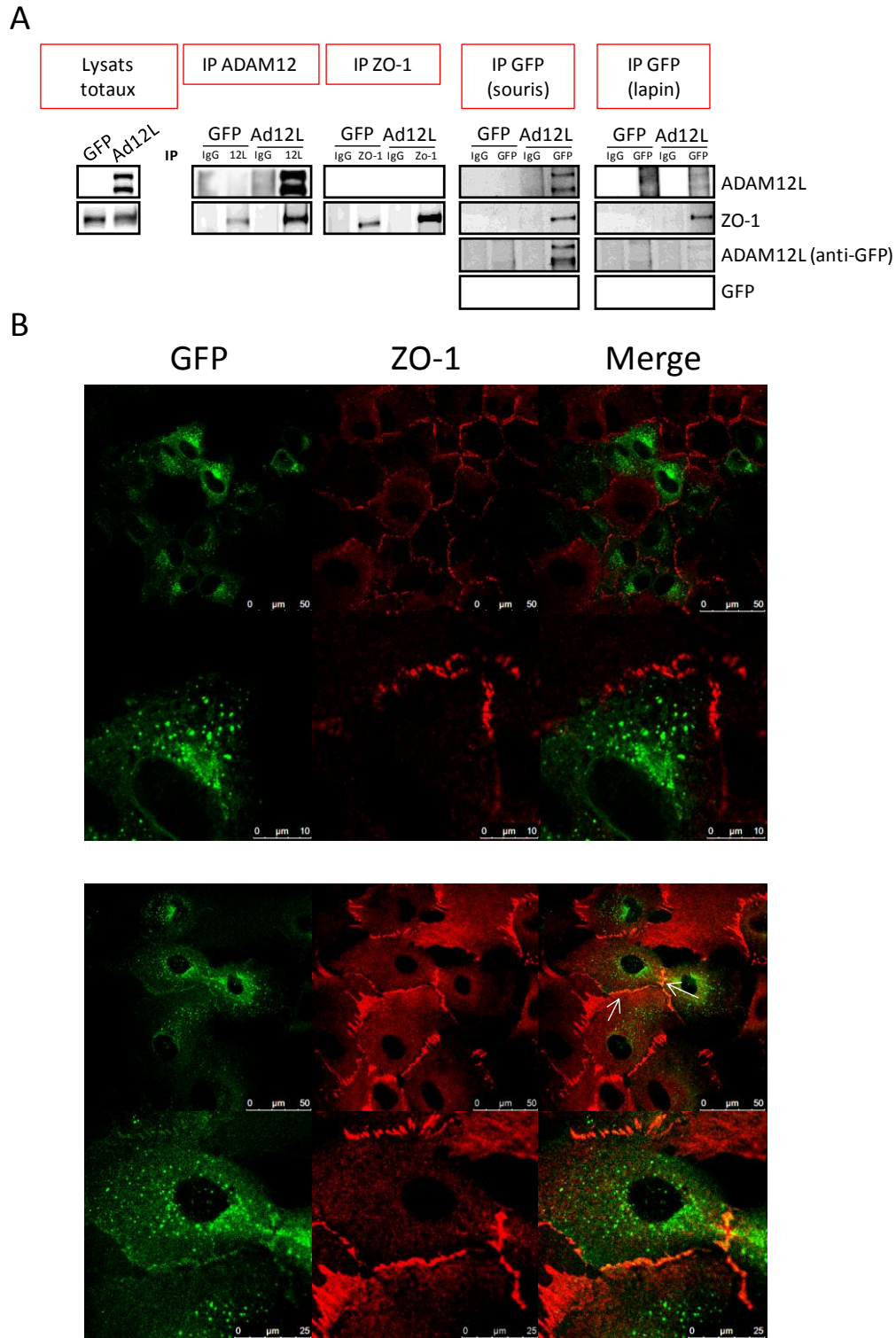
Enfin nous avons réalisé une IP avec deux anticorps dirigés contre la GFP, un anticorps de souris et un anticorps de lapin. L'anticorps dirigé contre la GFP nous a permis de révéler la présence d'ADAM12L-GFP mais pas de la GFP seule, suggérant que l'IP anti-GFP n'est efficace que sur la protéine de fusion. Dans les deux IP anti-GFP, la protéine ZO-1 est détectée uniquement dans les cellules MCF10A-ADAM12L suggérant une interaction spécifique entre ADAM12L et ZO-1 dans notre modèle. En résumé, il semble que ZO-1 et ADAM12L interagissent puisque la bande ZO-1 est peu (anti-ADAM12L) ou pas (anti-GFP) présente dans les cellules MCF10A contrôles alors que l'on observe une forte bande dans les cellules MCF10A surexprimant ADAM12L.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence sur les cellules MCF10A-ADAM12L. On peut observer dans quelques cellules une colocalisation d'ADAM12L et de ZO-1 au niveau membranaire (**Figure 49B**).

Afin de valider ces résultats dans un modèle d'expression endogène, nous avons utilisé les cellules étoilées du foie (CEF) qui expriment fortement ADAM12L. Nous avons pu montrer par une analyse western blot que ces cellules expriment ZO-1 de façon importante (**Figure 50**). Par ailleurs, l'IP anti-ADAM12L révèle la présence de ZO-1 alors qu'aucune bande n'est présente dans l'IP contrôle. Des expériences d'immunolocalisation sont en cours pour valider l'interaction dans ce modèle.

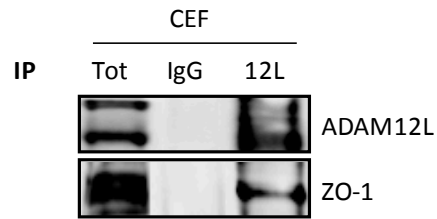
L'ensemble de ces résultats suggère une interaction entre ADAM12L et ZO-1, mais celle-ci pourrait être directe ou indirecte et transitoire au cours de l'EMT. Afin de répondre à cette question il faudra par exemple réaliser des expériences d'interaction avec des protéines purifiées et des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).





**Figure 49 : Etude de l'interaction entre ADAM12L et ZO-1 par immunoprécipitation et immunolocalisation dans les cellules MCF10A.**

(A) Analyse par Western Blot des produits de co-immunoprécipitation anti-ADAM12L , anti-ZO-1, anti-GFP (souris) et anti-GFP (lapin) sur les MCF10A contrôles (GFP) et les MCF10A surexprimant ADAM12L. (B) Analyse de la colocalisation d'ADAM12L (vert) et de ZO-1 (rouge) dans les MCF10A surexprimant ADAM12L.



**Figure 50 : Etude de l'interaction entre ADAM12L et ZO-1 par immunoprécipitation dans les cellules étoilées du foie.**

*Analyse par Western Blot des produits de co-immunoprécipitation réalisées avec des anticorps anti-ADAM12L ou des IgG non spécifiques sur des cellules étoilées du foie. Tot : Lysats totaux (20µg).*

## DISCUSSION GENERALE

---



# DISCUSSION GENERALE

---

La communication des cellules tumorales avec leur microenvironnement joue un rôle essentiel dans le développement et la progression tumorale. Dans ce contexte, les protéines de la famille ADAM constituent une nouvelle famille impliquée dans la régulation de ces signaux. ADAM12 en particulier est largement associée aux cancers. Son expression au sein de tissus mésenchymateux et son rôle dans la signalisation du TGF $\beta$  font d'elle un acteur potentiel dans la transition épithélio-mésenchymateuse, un processus majeur permettant aux cellules tumorales d'envahir de nouveaux tissus et de former des métastases. Nos travaux montrent pour la première fois un rôle de la forme membranaire d'ADAM12 dans l'EMT via la modulation des voies de signalisation du TGF $\beta$ .

## **ADAM12 : nouveau marqueur précoce de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse**

Dans un premier temps, nous avons montré que l'expression d'ADAM12L et d'ADAM12S est corrélée à celle des marqueurs de l'EMT *in vivo* dans des biopsies de tumeurs mammaires et *in vitro* dans des lignées cancéreuses mammaires confirmant ainsi les études montrant qu'ADAM12L est surexprimée dans les cancers TNBC (Li et al., 2012) et plus récemment dans le sous-type claudin-low, qui présente la signature EMT la plus forte parmi les sous-types de cancer du sein (Li et al., 2013). Par ailleurs, des études sur des modèles murins ont montré que la surexpression d'ADAM12 favorise l'agressivité des cellules tumorales (Kveiborg et al., 2005; Roy et al., 2011). En accord avec ces résultats nous avons montré que l'expression d'ADAM12L, ADAM12S et de la Vimentine est significativement augmentée chez les patients développant des métastases. Bien que significatifs, l'augmentation de l'expression d'ADAM12 et de la Vimentine chez la patients présentant des métastases reste modérée et suggère que l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux n'est pas suffisante pour induire la formation de métastases. Ces résultats sont en accord avec le fait que le sous-type claudin-low ne présente pas le pronostic le plus défavorable parmi les sous-types de cancer du sein (Prat et al., 2010).

Bien que fortement liées, les signatures géniques de cellules ayant subi l'EMT et de cellules souches cancéreuses ne se recoupent pas entièrement (Ben-Porath et al., 2008). En accord avec ces données, l'épithélialisation par inhibition du facteur de transcription Prrx1 a montré une épithélialisation des cellules associée à l'acquisition des marqueurs souches

CD44<sup>high</sup>/CD22<sup>low</sup> suggérant que l'EMT et la stemness des cellules peuvent être découplées (Ocaña et al., 2012). Le sous-type claudin-low, où est exprimée ADAM12L, possède une forte signature de cellules souches comparée aux autres sous-types, en revanche l'expression d'ADAM12 est augmentée dans les cellules souches embryonnaires différenciées par rapport aux cellules souches parentales (Kim et al., 2014) et dans les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux différenciées en cellules de muscles lisses (Do et al., 2012; Kim et al., 2012), suggérant qu'ADAM12 pourrait être un marqueur spécifique de l'EMT mais pas des cellules souches.

### **Induction de l'EMT par ADAM12L et le TGFβ**

Afin de rechercher le rôle d'ADAM12 dans l'EMT, nous l'avons surexprimée stablement dans les cellules MCF10A. De façon spontanée (sans traitement), les cellules MCF10A surexprimant ADAM12L subissent une EMT partielle caractérisée par une forme fibroblastique, la formation de fibres de stress, la diminution de la E-cadhérine et l'augmentation de la Vimentine. En revanche, nous n'avons pas observé de changement phénotypique dans les cellules épithéliales mammaires tumorales MCF7 surexprimant ADAM12L. Les cellules MCF7 appartiennent au sous-type luminal A et expriment les récepteurs aux œstrogènes (ER) et à la progestérone (PR) alors que les cellules MCF10A appartiennent au sous-type basal B et sont des TNBC (absence des récepteurs PR, ER et HER2). Aussi les capacités de réponse des MCF7 à un inducteur de l'EMT pourraient être très différentes de celles des MCF10A. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que les cellules de type luminal, et notamment les MCF7, ne répondent pas aussi bien au TGFβ que les cellules de type basal (Chaffer et al., 2013). En effet, malgré une activation des protéines SMADs, le TGFβ n'induit ni l'expression de Zeb1 ni un phénotype EMT. En revanche, l'expression forcée de Zeb1 dans ces cellules induit l'EMT suggérant que ces cellules sont réfractaires au signal TGFβ mais pas à l'EMT. Nous avons nous même confirmé que le TGFβ n'induit que faiblement l'EMT dans les cellules MCF7 après un traitement de 96h. Ces observations suggèrent donc que l'EMT induite par la surexpression d'ADAM12L requiert un contexte cellulaire particulier sans doute en relation avec le système de signalisation du TGFβ.

Démontrer ensuite que la présence d'ADAM12 est requise dans un mécanisme induit par le TGFβ alors que sa propre expression est fonction de ce même facteur n'est pas simple. Pour répondre à cette question, nous avons généré des cellules MCF10A exprimant un shRNA

dirigé contre ADAM12, empêchant ainsi son induction lors d'un traitement au TGF $\beta$ . Nous avons traité ces cellules avec des doses croissantes de TGF $\beta$  pendant 96H afin de trouver une fenêtre dans laquelle les effets du TGF $\beta$  ne sont pas saturants. En dépit de ce dispositif, nous n'avons observé qu'un faible effet de l'absence d'ADAM12 sur l'EMT induite par le TGF $\beta$  suggérant qu'ADAM12L n'est pas indispensable dans ces conditions expérimentales.

Une autre approche a consisté à éteindre l'expression d'ADAM12 dans des cellules tumorales exprimant ADAM12 de façon endogène afin de réverser leur phénotype mésenchymateux. L'absence d'effet de l'extinction d'ADAM12 dans ces lignées est similaire aux observations reportées précédemment pour des inducteurs de l'EMT. Par exemple, l'inhibition de TWIST1, facteur de transcription pro-EMT, dans les cellules tumorales mammaires BT549 n'induit pas leur réversion (Ocaña et al., 2012). Ces observations ne sont pas contradictoires avec le rôle de ces protéines dans l'EMT. En effet, d'après le modèle de Weinberg, l'état épithélial d'une cellule est une caractéristique par défaut de la cellule. En présence de signaux pro-EMT, comme le TGF $\beta$ , les cellules passent dans un état intermédiaire métastable puis réversent après la fin du traitement. Néanmoins, les cellules peuvent aussi passer à un état mésenchymateux stable caractérisé par des modifications épigénétiques particulières et la présence de boucles de régulation autocrines (Tam and Weinberg, 2013). Dans ce contexte, l'inhibition d'une protéine qui participe à l'EMT ne permet pas nécessairement une réversion du phénotype.

### **La modulation des voies de signalisation du TGF $\beta$ par ADAM12L est associée à la dynamique membranaire**

Le TGF $\beta$  est une cytokine majeure dans la régulation de la progression tumorale, mais son rôle est complexe. Anti-tumorale dans les phases précoces et pro-invasif dans les phases tardives, ses effets sur une cellule dépendent d'une combinatoire de signaux provenant de la cellule mais aussi et surtout de son microenvironnement. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les différentes fonctions du TGF $\beta$  au cours de la tumorigenèse reste un enjeu majeur pour le développement de nouvelles thérapies ciblées.

Dans ce contexte, notre laboratoire a précédemment montré qu'ADAM12L interagissait avec le T $\beta$ RII et induisait les voies de signalisation du TGF $\beta$ , aussi bien la voie SMAD (Atfi et al., 2007), que les voies non-SMADs incluant la voie PI3K/AKT (Leyme et al., 2012). Au cours

de nos propres travaux, nous avons observé une activation des protéines SMAD3, AKT et ERK dans les cellules MCF10A surexprimant ADAM12L. L'utilisation d'inhibiteurs de T $\beta$ RI et de MEK (et donc de ERK) réverse partiellement le phénotype induit par ADAM12L montrant leur importance dans le maintien du phénotype mésenchymateux. L'ensemble de ces données suggère qu'ADAM12L module des voies de signalisation connues pour médier l'EMT par le TGF $\beta$  et plus particulièrement la voie ERK par un mécanisme impliquant au moins en partie le récepteur au TGF $\beta$  plutôt que la libération de ligands de l'EGFR, comme cela a pu être décrit dans d'autres modèles. Ces résultats ont été confirmés par nos expériences montrant qu'un mutant d'ADAM12L délété pour son activité métalloprotéase et donc incapable de cliver les ligands de l'EGFR, est toujours capable d'induire l'EMT. De façon intéressante, la surexpression d'ADAM12L reproduit une partie des effets du TGF $\beta$  sur les cellules MCF10A mais pas tous. Ainsi la surexpression d'ADAM12L induit l'EMT, une augmentation de la résistance à l'apoptose et une baisse de prolifération mais n'a pas d'effet sur la migration.

L'un des paramètres majeurs contribuant à la réponse cellulaire au signal TGF $\beta$  est la localisation subcellulaire de ses récepteurs. Ainsi, les récepteurs du TGF $\beta$  peuvent se localiser dans différents microdomaines membranaires dans des régions de type radeaux lipidiques ou non radeaux lipidiques ainsi que dans les endosomes (Le Roy and Wrana, 2005). De façon très intéressante, il a été récemment montré que cette localisation induit les voies MAPK et est nécessaire à l'induction de l'EMT par le TGF $\beta$  (Zuo and Chen, 2009). De même, ADAM12L est relocalisée dans les radeaux lipidiques dans des cellules mésenchymateuses traitées au TGF $\beta$  (Kim et al., 2012). Dans notre modèle de surexpression, nous provoquons l'accumulation d'ADAM12L dans des zones périnucléaires comme cela a déjà été observé dans d'autres modèles. De façon plus intéressante, nous avons identifié ADAM12L dans les endosomes par colocalisation avec la protéine marqueur des endosomes précoces EEA1 (résultats non montrés) mais aussi dans des microdomaines de types radeaux lipidiques. De façon particulièrement intéressante, Src, qui est enrichie dans les radeaux lipidiques (Liang et al., 2001), est impliquée dans la phosphorylation de T $\beta$ RII et pourrait fournir des sites d'ancrage pour les protéines adaptatrices Grb2 et ShcA et mener ainsi à l'activation des MAPK (Galliher and Schiemann, 2007). Les trois protéines Src, Grb2 et T $\beta$ RII sont tous les trois des interactants physiques d'ADAM12L dont l'expression induit une forte activation de la voie ERK dans notre modèle. Par ailleurs, parmi les 15 protéines relocalisées avec ADAM12L dans les radeaux lipidiques en réponse au TGF $\beta$  dans les cellules souches



mésenchymateuses (Kim et al., 2012), les protéines Kiddins220 et Rap1A ont été impliqués dans l'activation de la voie ERK (Arévalo et al., 2006). De plus, Rap1A a été directement liée à la signalisation TGF $\beta$  (Nikolaos Patsoukis *et al.*, présentation orale au 53e congrès de American society and Hematology, 2011) et contribue à l'induction de l'EMT (Okada et al., 2015). En accord avec ces observations, nous avons émis l'hypothèse qu'**ADAM12L pourrait se localiser dans des régions de type radeaux lipidiques au sein d'une "plate-forme" de signalisation comprenant T $\beta$ RII, Src, Grb2, Kiddins220 et Rap1A, et être un élément clé dans l'induction de l'EMT et l'activation de la voie ERK.** Nos résultats préliminaires ne montrent pas d'activation de Rap1A dans les cellules surexprimant ADAM12L, néanmoins ce type d'évènement est hautement dynamique et dans ce contexte, notre modèle de surexpression montre ses limites. En effet, il est peu adapté à une compréhension des mécanismes moléculaires impliqués au cours de l'EMT puisqu'il nous permet uniquement d'étudier l'état épithélial d'une part et l'état mésenchymateux d'autre part, mais pas la dynamique permettant de passer d'un état à l'autre. Un modèle d'EMT induite par le TGF $\beta$  serait idéal, néanmoins ce type de modèle est peu sensible et rend difficile voire impossible la détection des effets d'ADAM12L, d'autant que sa dynamique d'activation est déjà complexe. Alternativement, il serait intéressant d'utiliser un modèle dans lequel on pourrait induire l'expression d'ADAM12L (induction à la doxycycline par exemple) à un niveau plus physiologique. **L'ensemble de ces observations suggère qu'ADAM12L pourrait agir de façon spécifique sur certaines composantes du système de signalisation du TGF $\beta$  modulant ainsi des fonctions particulières du TGF $\beta$ .**

L'importance de la dynamique membranaire de la protéine ADAM12 dans la modulation des signaux cellulaires est renforcée par les résultats de nos données de protéomique. En effet, l'identification de ZO-1 et ZO-2 comme interactants potentiels d'ADAM12L dans notre modèle de surexpression suggère qu'ADAM12L aurait un rôle dans l'altération des jonctions serrées qui participent à l'intégrité des épithéliums et sont désassemblées au cours de l'EMT. ZO-1 est exprimée dans les jonctions serrées des cellules épithéliales dans lesquels ADAM12L n'est pas exprimée, aussi l'interaction en ADAM12L et ZO-1, si elle existe, est un évènement transitoire de la dédifférenciation des cellules. A noter que dans des lignées de cancers du sein, ADAM12L est préférentiellement exprimée dans le sous-type de cancer mammaire claudin-low (Li et al., 2013), la claudine étant une des protéines majeures des jonctions serrées interagissant avec ZO-1 et ZO-2 (Günzel and Fromm, 2012).

Notre hypothèse est que le **TGFβ induit l'expression d'ADAM12L qui contribuerait à l'EMT en facilitant le désassemblage des jonctions serrées**. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'ADAM12L est un interactant du TβRII, qui est lui même relocalisé avec TβRI dans des régions riches en ZO-1 en réponse à un signal TGFβ (Ozdamar et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré que la protéine Rap1 est un régulateur clé de la formation des jonctions cellulaires (Kooistra et al., 2007) et notamment des jonctions serrées (Wittchen et al., 2005).

Comme nous l'avons dit précédemment, l'étude des relations entre ADAM12L, le TGFβ et les protéines ZO nécessiterait un modèle dynamique d'EMT. La pertinence d'une relation entre ADAM12L et ZO-1 pourrait néanmoins être évaluée dans d'autres contextes. Par exemple, il a été montré que les jonctions serrées jouent un rôle majeur dans les processus de fusion cellulaire, au cours de la myogenèse (Developmental Regulation : Aspects of Cell Differentiation, Stuart Coward) et de la fusion des trophoblastes (Pidoux et al., 2010), or ADAM12 a été décrite comme un acteur majeur de ces processus (Aghababaei et al., 2015; Yagami-Hiromasa et al., 1995). Dans ces phénomènes de fusion, une inhibition de l'expression de ZO-1 empêche la fusion des trophoblastes (Pidoux et al., 2010). Ainsi, la présence de jonctions serrées est requise pour la fusion cellulaire, mais on peut imaginer qu'ADAM12L puisse permettre le désassemblage de ces jonctions à un moment bien précis du processus de fusion. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la fusion cellulaire induite par ADAM12 pourrait avoir un impact dans plusieurs domaines comme la réparation musculaire et les bonnes fonctions placentaires, mais aussi potentiellement dans le cancer. En effet, plusieurs théories expliquent l'acquisition de capacités invasives ou de propriétés souches par des mécanismes de fusion cellulaire des cellules tumorales, avec par exemple, des macrophages ou des cellules souches (Lu and Kang, 2011; Pawelek, 2014).

## Conclusion

Sur la base de nos travaux et des données de la littérature, nous avons établi un modèle hypothétique de l'action d'ADAM12L au cours de l'EMT induite par le TGFβ (**Figure 51**).

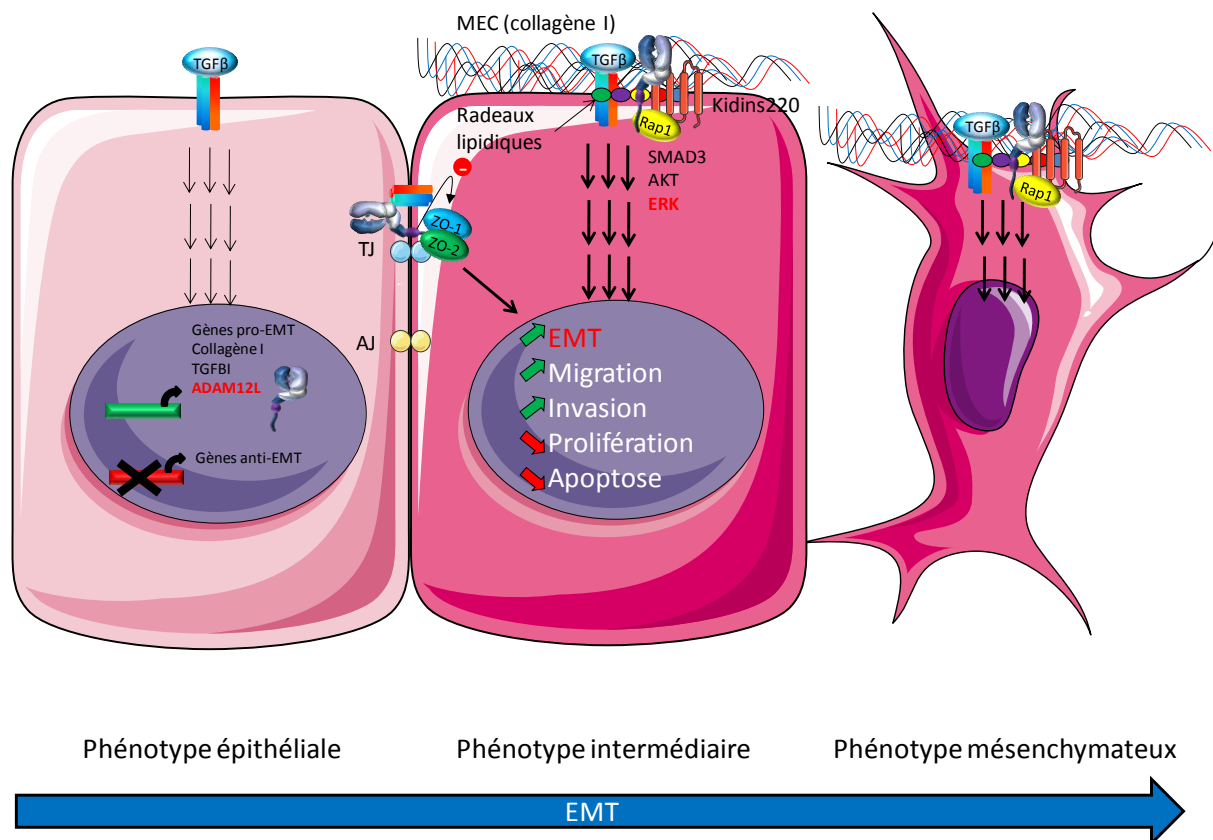
Dans un microenvironnement tumoral, le TGFβ sécrété en grande quantité, se fixe à ses récepteurs sur les cellules épithéliales tumorales et induit des voies de signalisation

aboutissant à la répression des gènes épithéliaux et à l'induction de gènes mésenchymateux dont la forme membranaire d'ADAM12.

En interagissant avec le récepteur au TGF $\beta$ , ADAM12L contribuerait à l'activation des voies de signalisation SMAD et non-SMADs (ERK et PI3K). L'activation de la voie ERK pourrait impliquer un complexe de signalisation comprenant T $\beta$ RII, Src, Grb2, Kidins220, Rap1A et ADAM12L au niveau des microdomaines membranaires. Par ailleurs, ADAM12L recrutée avec les récepteurs au TGF $\beta$  au niveau des jonctions serrées pourrait faciliter leur désassemblage via son interaction avec ZO-1 et ZO-2.

L'ensemble de ces signaux contribue à l'activation d'un programme EMT caractérisé par un changement d'expression des marqueurs de l'EMT, une augmentation des capacités de migration et d'invasion, et une diminution de la prolifération et de l'apoptose.

En conclusion, nos résultats révèlent pour la première fois un rôle de la forme membranaire d'ADAM12 dans l'EMT en relation avec la signalisation du TGF $\beta$ . L'utilisation d'un modèle cellulaire dynamique est nécessaire pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation du signal TGF $\beta$  et du désassemblage des jonctions serrées par ADAM12L. Ces études pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques dans le cadre du cancer, mais aussi dans des maladies en lien avec le TGF $\beta$  comme la fibrose.



**Figure 51 : Modèle hypothétique de l'action d'ADAM12L au cours de l'EMT induite par le TGFβ.**

*TJ : Jonctions serrées. AJ : Jonctions adhérentes.*

## BIBLIOGRAPHIE

---



# BIBLIOGRAPHIE

---

- Abe, E., Mocharla, H., Yamate, T., Taguchi, Y., and Manolagas, S.C. (1999). Meltrin-alpha, a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation. *Calcif. Tissue Int.* 64, 508–515.
- Abram, C.L., Seals, D.F., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T.M., and Courtneidge, S.A. (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J. Biol. Chem.* 278, 16844–16851.
- Aghababaei, M., Hogg, K., Perdu, S., Robinson, W.P., and Beristain, A.G. (2015). ADAM12-directed ectodomain shedding of E-cadherin potentiates trophoblast fusion. *Cell Death Differ.*
- Albrechtsen, R., Stautz, D., Sanjay, A., Kveiborg, M., and Wewer, U.M. (2011). Extracellular engagement of ADAM12 induces clusters of invadopodia with localized ectodomain shedding activity. *Exp. Cell Res.* 317, 195–209.
- Albrechtsen, R., Kveiborg, M., Stautz, D., Vikeså, J., Noer, J.B., Kotzsh, A., Nielsen, F.C., Wewer, U., and Fröhlich, C. (2013). ADAM12 redistributes and activates MMP-14, resulting in gelatin degradation, reduced apoptosis, and increased tumor growth. *J. Cell Sci.*
- Alcorn, J.F., Guala, A.S., van der Velden, J., McElhinney, B., Irvin, C.G., Davis, R.J., and Janssen-Heininger, Y.M.W. (2008). Jun N-terminal kinase 1 regulates epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- $\beta$ 1. *J. Cell Sci.* 121, 1036–1045.
- Allen, K.E., and Weiss, G.J. (2010). Resistance May Not Be Futile: microRNA Biomarkers for Chemoresistance and Potential Therapeutics. *Mol. Cancer Ther.* 9, 3126–3136.
- Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.-P., Bouchet, B.P., Thomas, C., Fauvet, F., Puisieux, I., Doglioni, C., Piccinin, S., et al. (2008). Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell* 14, 79–89.
- Arévalo, J.C., Pereira, D.B., Yano, H., Teng, K.K., and Chao, M.V. (2006). Identification of a Switch in Neurotrophin Signaling by Selective Tyrosine Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 1001–1007.
- Arnoux, V., Nassour, M., L’Helgoualc’h, A., Hipskind, R.A., and Savagner, P. (2008). Erk5 Controls Slug Expression and Keratinocyte Activation during Wound Healing. *Mol. Biol. Cell* 19, 4738–4749.
- Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K.F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J.L., Gallick, G.E., Logsdon, C.D., McConkey, D.J., and Choi, W. (2009). Epithelial to Mesenchymal Transition Contributes to Drug Resistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 69, 5820–5828.
- Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., et al. (2002). Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat. Med.* 8, 35–40.

- Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., and Sporn, M.B. (1983). Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 258, 7155–7160.
- Atfi, A., Dumont, E., Colland, F., Bonnier, D., L'helgoualc'h, A., Prunier, C., Ferrand, N., Clément, B., Wewer, U.M., and Théret, N. (2007). The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor. *J. Cell Biol.* 178, 201–208.
- Baertling, F., Kokozidou, M., Pufe, T., Clarner, T., Windoffer, R., Wruck, C.J., Brandenburg, L.-O., Beyer, C., and Kipp, M. (2010). ADAM12 is expressed by astrocytes during experimental demyelination. *Brain Res.* 1326, 1–14.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., and Arteaga, C.L. (2000a). Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor  $\beta$ -mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 275, 36803–36810.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., and Arteaga, C.L. (2000b). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J. Biol. Chem.* 275, 36803–36810.
- Balzac, F., Avolio, M., Degani, S., Kaverina, I., Torti, M., Silengo, L., Small, J.V., and Retta, S.F. (2005). E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *J. Cell Sci.* 118, 4765–4783.
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., et al. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 23, 2134–2139.
- Baraniak, A.P., Chen, J.R., and Garcia-Blanco, M.A. (2006). Fox-2 Mediates Epithelial Cell-Specific Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Exon Choice. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1209–1222.
- Barrallo-Gimeno, A., and Nieto, M.A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151–3161.
- Barter, M.J., Pybus, L., Litherland, G.J., Rowan, A.D., Clark, I.M., Edwards, D.R., Cawston, T.E., and Young, D.A. (2010). HDAC-mediated control of ERK- and PI3K-dependent TGF- $\beta$ -induced extracellular matrix-regulating genes. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 29, 602–612.
- Bartholin, L., Destaing, O., Forissier, S., Martel, S., Maguer-Satta, V., Jurdic, P., and Rimokh, R. (2005). FLRG, a new ADAM12-associated protein, modulates osteoclast differentiation. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 97, 577–588.
- Bass, A.J., Watanabe, H., Mermel, C.H., Yu, S., Perner, S., Verhaak, R.G., Kim, S.Y., Wardwell, L., Tamayo, P., Gat-Viks, I., et al. (2009). SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* 41, 1238–1242.



- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., and Bauer, H.C. (2010). The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010.
- Bax, N.A.M., Pijnappels, D.A., van Oorschot, A.A.M., Winter, E.M., de Vries, A.A.F., van Tuyn, J., Braun, J., Maas, S., Schalij, M.J., Atsma, D.E., et al. (2011). Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 2675–2683.
- Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., Regev, A., and Weinberg, R.A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* 40, 499–507.
- Bergert, M., Chandradoss, S.D., Desai, R.A., and Paluch, E. (2012). Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14434–14439.
- Bernstein, H.-G., Keilhoff, G., Bukowska, A., Ziegeler, A., Funke, S., Dobrowolny, H., Kanakis, D., Bogerts, B., and Lendeckel, U. (2004). ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 12 is expressed in rat and human brain and localized to oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* 75, 353–360.
- Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., and Moses, H.L. (2001a). Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. *Mol. Biol. Cell* 12, 27–36.
- Bhowmick, N.A., Zent, R., Ghiassi, M., McDonnell, M., and Moses, H.L. (2001b). Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J. Biol. Chem.* 276, 46707–46713.
- Biadasiewicz, K., Fock, V., Dekan, S., Proestling, K., Velicky, P., Haider, S., Knöfler, M., Fröhlich, C., and Pollheimer, J. (2014). Extravillous Trophoblast-Associated ADAM12 Exerts Pro-Invasive Properties, Including Induction of Integrin Beta 1-Mediated Cellular Spreading. *Biol. Reprod.* 90, 101.
- Bierie, B., and Moses, H.L. (2006). Tumour microenvironment: TGF $\beta$ : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 506–520.
- Bill, R., and Christofori, G. (2015). The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality? *FEBS Lett.* 589, 1577–1587.
- Boissy, P., Lenhard, T.R., Kirkegaard, T., Peschon, J.J., Black, R.A., Delaissé, J.-M., and del Carmen Ovejero, M. (2003). An assessment of ADAMs in bone cells: absence of TACE activity prevents osteoclast recruitment and the formation of the marrow cavity in developing long bones. *FEBS Lett.* 553, 257–261.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.

Borneman, A., Kuschel, R., and Fujisawa-Sehara, A. (2000). Analysis for transcript expression of meltrin alpha in normal, regenerating, and denervated rat muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *21*, 475–480.

Bourd-Boittin, K., Le Pabic, H., Bonnier, D., L'Helgoualc'h, A., and Théret, N. (2008). RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.* *283*, 26000–26009.

Bourd-Boittin, K., Bonnier, D., Leyme, A., Mari, B., Tuffery, P., Samson, M., Ezan, F., Baffet, G., and Theret, N. (2011). Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta. *Hepatology* *54*, 2173–2184.

Boutet, A., Frutos, C.A.D., Maxwell, P.H., Mayol, M.J., Romero, J., and Nieto, M.A. (2006). Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J.* *25*, 5603–5613.

Brunet, F.G., Fraser, F.W., Binder, M.J., Smith, A.D., Kintakas, C., Dancevic, C.M., Ward, A.C., and McCulloch, D.R. (2015). The evolutionary conservation of the A Disintegrin-like and Metalloproteinase domain with Thrombospondin-1 motif metzincins across vertebrate species and their expression in teleost zebrafish. *BMC Evol. Biol.* *15*.

Cal, S., and López-Ot  n, C. (2015). ADAMTS proteases and cancer. *Matrix Biol.* *44–46*, 77–85.

Cao, Y., Kang, Q., Zhao, Z., and Zolkiewska, A. (2002). Intracellular Processing of Metalloprotease Disintegrin ADAM12. *J. Biol. Chem.* *277*, 26403–26411.

Cao, Y., Zhao, Z., Gruszczynska-Biegala, J., and Zolkiewska, A. (2003). Role of Metalloprotease Disintegrin ADAM12 in Determination of Quiescent Reserve Cells during Myogenic Differentiation In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6725–6738.

Carl-McGrath, S., Lendeckel, U., Ebert, M., Roessner, A., and Röcken, C. (2005). The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int. J. Oncol.*

Carver, E.A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K.F., and Gridley, T. (2001). The Mouse Snail Gene Encodes a Key Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 8184–8188.

del Castillo, G., Murillo, M.M., Álvarez-Barrientos, A., Bertran, E., Fernández, M., Sánchez, A., and Fabregat, I. (2006). Autocrine production of TGF-   confers resistance to apoptosis after an epithelial–mesenchymal transition process in hepatocytes: Role of EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* *312*, 2860–2871.

Cedar, H., and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 295–304.

Chaffer, C.L., Brennan, J.P., Slavin, J.L., Blick, T., Thompson, E.W., and Williams, E.D. (2006). Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2. *Cancer Res.* *66*, 11271–11278.

- Chaffer, C.L., Marjanovic, N.D., Lee, T., Bell, G., Kleer, C.G., Reinhardt, F., D'Alessio, A.C., Young, R.A., and Weinberg, R.A. (2013). Poised Chromatin at the ZEB1 Promoter Enables Breast Cancer Cell Plasticity and Enhances Tumorigenicity. *Cell* 154, 61–74.
- Chandeck, C., and Mooi, W.J. (2010). Oncogene-induced cellular senescence. *Adv. Anat. Pathol.* 17, 42–48.
- Chang, J.C., Wooten, E.C., Tsimelzon, A., Hilsenbeck, S.G., Gutierrez, M.C., Tham, Y.-L., Kalidas, M., Elledge, R., Mohsin, S., Osborne, C.K., et al. (2005). Patterns of Resistance and Incomplete Response to Docetaxel by Gene Expression Profiling in Breast Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.* 23, 1169–1177.
- Cheon, D.-J., Li, A.J., Beach, J.A., Walts, A.E., Tran, H., Lester, J., Karlan, B.Y., and Orsulic, S. (2015). ADAM12 is a prognostic factor associated with an aggressive molecular subtype of high-grade serous ovarian carcinoma. *Carcinogenesis*.
- Chlenski, A., Ketels, K.V., Korovaitseva, G.I., Talamonti, M.S., Oyasu, R., and Scarpelli, D.G. (2000). Organization and expression of the human zo-2 gene (tjp-2) in normal and neoplastic tissues1. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1493, 319–324.
- Christiansen, J.J., and Rajasekaran, A.K. (2006). Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis. *Cancer Res.* 66, 8319–8326.
- Christiansen, M., Pihl, K., Hedley, P.L., Gjerris, A.-C., Lind, P.Ø., Larsen, S.O., Krebs, L., and Larsen, T. (2010). ADAM 12 may be used to reduce the false positive rate of first trimester combined screening for Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 30, 110–114.
- Christoffersen, N.R., Silahatoglu, A., Ørom, U.A., Kauppinen, S., and Lund, A.H. (2007). miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFX1B. *RNA* 13, 1172–1178.
- Comunale, F., Causeret, M., Favard, C., Cau, J., Taulet, N., Charrasse, S., and Gauthier-Rouvière, C. (2007). Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell—cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biol. Cell* 99, 503–517.
- Deheuninck, J., and Luo, K. (2009). Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res.* 19, 47–57.
- Derksen, P.W.B., Liu, X., Saridin, F., van der Gulden, H., Zevenhoven, J., Evers, B., van Beijnum, J.R., Griffioen, A.W., Vink, J., Krimpenfort, P., et al. (2006). Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* 10, 437–449.
- Derynck, R., Gelbart, W.M., Harland, R.M., Heldin, C.-H., Kern, S.E., Massagué, J., Melton, D.A., Mlodzik, M., Padgett, R.W., Roberts, A.B., et al. (1996). Nomenclature: Vertebrate Mediators of TGF $\beta$  Family Signals. *Cell* 87, 173.
- Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S., and Akhurst, R.J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121, 1845–1854.

- Dillon, L.W., Pierce, L.C.T., Ng, M.C.Y., and Wang, Y.-H. (2013). Role of DNA secondary structures in fragile site breakage along human chromosome 10. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1443–1456.
- Do, E.K., Kim, Y.M., Heo, S.C., Kwon, Y.W., Shin, S.H., Suh, D.-S., Kim, K.-H., Yoon, M.-S., and Kim, J.H. (2012). Lysophosphatidic acid-induced ADAM12 expression mediates human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-stimulated tumor growth. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 2069–2076.
- Doğru, E.B., Dizdar, Y., Akşit, E., Ural, F., Şanlı, Ö., and Yasasever, V. (2014). EMMPRIN and ADAM12 in prostate cancer: preliminary results of a prospective study. *Tumor Biol.* 35, 11647–11653.
- Dong, C., Wu, Y., Yao, J., Wang, Y., Yu, Y., Rychahou, P.G., Evers, B.M., and Zhou, B.P. (2012). G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* 122, 1469–1486.
- Dubail, J., and Apte, S.S. (2015). Insights on ADAMTS proteases and ADAMTS-like proteins from mammalian genetics. *Matrix Biol.* 44–46, 24–37.
- Duffy, M.J., McKiernan, E., O'Donovan, N., and McGowan, P.M. (2009). Role of ADAMs in Cancer Formation and Progression. *Clin. Cancer Res.* 15, 1140–1144.
- Duhachek-Muggy, S., and Zolkiewska, A. (2015). ADAM12-L is a direct target of the miR-29 and miR-200 families in breast cancer. *BMC Cancer* 15.
- Duhachek-Muggy, S., Li, H., Qi, Y., and Zolkiewska, A. (2013). Alternative mRNA Splicing Generates Two Distinct ADAM12 Prodomain Variants. *PloS One* 8, e75730.
- Dvinge, H., Git, A., Gräf, S., Salmon-Divon, M., Curtis, C., Sottoriva, A., Zhao, Y., Hirst, M., Armisen, J., Miska, E.A., et al. (2013). The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature* 497, 378–382.
- Dyczynska, E., Sun, D., Yi, H., Sehara-Fujisawa, A., Blobel, C.P., and Zolkiewska, A. (2007). Proteolytic Processing of Delta-like 1 by ADAM Proteases. *J. Biol. Chem.* 282, 436–444.
- Dyczynska, E., Syta, E., Sun, D., and Zolkiewska, A. (2008). Breast cancer-associated mutations in metalloprotease disintegrin ADAM12 interfere with the intracellular trafficking and processing of the protein. *Int. J. Cancer* 122, 2634–2640.
- Eckert, M.A., and Yang, J. (2011). Targeting invadopodia to block breast cancer metastasis. *Oncotarget* 2, 562–568.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 29, 258–289.
- Etique, N., Verzeaux, L., Dedieu, S., and Emonard, H. (2013). LRP-1: A Checkpoint for the Extracellular Matrix Proteolysis. *BioMed Res. Int.* 2013.

- Eto, K., Puzon-McLaughlin, W., Sheppard, D., Sehara-Fujisawa, A., Zhang, X.P., and Takada, Y. (2000). RGD-independent binding of integrin  $\alpha 9\beta 1$  to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J. Biol. Chem.* 275, 34922–34930.
- Eto, K., Huet, C., Tarui, T., Kupriyanov, S., Liu, H.-Z., Puzon-McLaughlin, W., Zhang, X.-P., Sheppard, D., Engvall, E., and Takada, Y. (2002). Functional Classification of ADAMs Based on a Conserved Motif for Binding to Integrin  $\alpha 9\beta 1$  IMPLICATIONS FOR SPERM-EGG BINDING AND OTHER CELL INTERACTIONS. *J. Biol. Chem.* 277, 17804–17810.
- Farkas, N., Lendeckel, U., Dobrowolny, H., Funke, S., Steiner, J., Keilhoff, G., Schmitt, A., Bogerts, B., and Bernstein, H.-G. (2010). Reduced density of ADAM 12-immunoreactive oligodendrocytes in the anterior cingulate white matter of patients with schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry* 11, 556–566.
- Fedak, P.W.M., Moravec, C.S., McCarthy, P.M., Altamentova, S.M., Wong, A.P., Skrtic, M., Verma, S., Weisel, R.D., and Li, R.-K. (2006). Altered Expression of Disintegrin Metalloproteinases and Their Inhibitor in Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 113, 238–245.
- Felton, V.M., Inge, L.J., Willis, B.C., Bremner, R.M., and Smith, M.A. (2011). Immunosuppression-induced bronchial epithelial-mesenchymal transition: a potential contributor to obliterative bronchiolitis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 141, 523–530.
- Fontemaggi, G., Gurtner, A., Strano, S., Higashi, Y., Sacchi, A., Piaggio, G., and Blandino, G. (2001). The Transcriptional Repressor ZEB Regulates p73 Expression at the Crossroad between Proliferation and Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8461–8470.
- Forbes, K., and Westwood, M. (2008). The IGF Axis and Placental Function. *Horm. Res.* 69, 129–137.
- Fralix, K.D., Zhao, S., Venkatasubbarao, K., and Freeman, J.W. (2003). Rap1 reverses transcriptional repression of TGF- $\beta$  type II receptor by a mechanism involving AP-1 in the human pancreatic cancer cell line, UK Pan-1. *J. Cell. Physiol.* 194, 88–99.
- Franco, D.L., Mainez, J., Vega, S., Sancho, P., Murillo, M.M., Frutos, C.A. de, del Castillo, G., López-Blau, C., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2010). Snail1 suppresses TGF- $\beta$ -induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes. *J. Cell Sci.* 123, 3467–3477.
- Frisch, S.M., Schaller, M., and Cieply, B. (2013). Mechanisms that link the oncogenic epithelial–mesenchymal transition to suppression of anoikis. *J. Cell Sci.* 126, 21–29.
- Fröhlich, C., Albrechtsen, R., Dyrskjöt, L., Rudkjaer, L., Ørntoft, T.F., and Wewer, U.M. (2006). Molecular profiling of ADAM12 in human bladder cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 7359–7368.
- Fröhlich, C., Nehammer, C., Albrechtsen, R., Kronqvist, P., Kveiborg, M., Sehara-Fujisawa, A., Mercurio, A.M., and Wewer, U.M. (2011). ADAM12 produced by tumor cells rather than stromal cells accelerates breast tumor progression. *Mol. Cancer Res. MCR* 9, 1449–1461.
- Fröhlich, C., Klitgaard, M., Noer, J., Kotzsch, A., Nehammer, C., Kronqvist, P., Berthelsen, J., Blobel, C., Kveiborg, M., Albrechtsen, R., et al. (2013). ADAM12 is expressed in the

tumour vasculature and mediates ectodomain shedding of several membrane-anchored endothelial proteins. *Biochem. J.*

Gal, A., Sjöblom, T., Fedorova, L., Imreh, S., Beug, H., and Moustakas, A. (2007). Sustained TGF $\beta$  exposure suppresses Smad and non-Smad signalling in mammary epithelial cells, leading to EMT and inhibition of growth arrest and apoptosis. *Oncogene* 27, 1218–1230.

Galliano, M.-F., Huet, C., Frygeliuss, J., Polgren, A., Wewer, U.M., and Engvall, E. (2000). Binding of ADAM12, a Marker of Skeletal Muscle Regeneration, to the Muscle-specific Actin-binding Protein,  $\alpha$ -Actinin-2, Is Required for Myoblast Fusion. *J. Biol. Chem.* 275, 13933–13939.

Galliher, A.J., and Schiemann, W.P. (2006). Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res. BCR* 8, R42.

Galliher, A.J., and Schiemann, W.P. (2007). Src Phosphorylates Tyr284 in TGF- $\beta$  Type II Receptor and Regulates TGF- $\beta$  Stimulation of p38 MAPK during Breast Cancer Cell Proliferation and Invasion. *Cancer Res.* 67, 3752–3758.

Galliher-Beckley, A.J., and Schiemann, W.P. (2008). Grb2 binding to Tyr284 in T $\beta$ R-II is essential for mammary tumor growth and metastasis stimulated by TGF- $\beta$ . *Carcinogenesis* 29, 244–251.

Georges, S., Chesneau, J., Hervouet, S., Taurelle, J., Gouin, F., Redini, F., Padrines, M., Heymann, D., Fortun, Y., and Verrecchia, F. (2013). A Disintegrin And Metalloproteinase 12 produced by tumour cells accelerates osteosarcoma tumour progression and associated osteolysis. *Eur. J. Cancer* 49, 2253–2263.

Gilpin, B.J., Loechel, F., Mattei, M.-G., Engvall, E., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (1998). A Novel, Secreted Form of Human ADAM 12 (Meltrin  $\alpha$ ) Provokes Myogenesis in Vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 157–166.

Grände, M., Franzen, Å., Karlsson, J.-O., Ericson, L.E., Heldin, N.-E., and Nilsson, M. (2002). Transforming growth factor- $\beta$  and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J. Cell Sci.* 115, 4227–4236.

Grelrier, G., Voirin, N., Ay, A.-S., Cox, D.G., Chabaud, S., Treilleux, I., Léon-Goddard, S., Rimokh, R., Mikaelian, I., Venoux, C., et al. (2009). Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype. *Br. J. Cancer* 101, 673–683.

Gruel, J., Leborgne, M., LeMeur, N., and Théret, N. (2009). In silico investigation of ADAM12 effect on TGF-beta receptors trafficking. *BMC Res. Notes* 2, 193.

Günzel, D., and Fromm, M. (2012). Claudins and Other Tight Junction Proteins. In *Comprehensive Physiology*, (John Wiley & Sons, Inc.),.

Guo, L.T., Diane Shelton, G., Wewer, U.M., and Engvall, E. (2005). ADAM12 overexpression does not improve outcome in mice with laminin  $\alpha 2$ -deficient muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* *15*, 786–789.

Gupta, P.B., Fillmore, C.M., Jiang, G., Shapira, S.D., Tao, K., Kuperwasser, C., and Lander, E.S. (2011). Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. *Cell* *146*, 633–644.

Haddad, Y., Choi, W., and McConkey, D.J. (2009). The transcriptional repressor Delta EF1 controls the EMT phenotype and resistance to the EGFR inhibitor erlotinib in human head & neck squamous cell carcinoma lines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 532–542.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 3983–3988.

Harris, H.A., Murrills, R.J., and Komm, B.S. (1997). Expression of meltrin- $\alpha$  mRNA is not restricted to fusagenic cells. *J. Cell. Biochem.* *67*, 136–142.

Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C. (2007). Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell* *1*, 313–323.

Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., et al. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* *8*, R76.

Hesling, C., Fattet, L., Teyre, G., Jury, D., Gonzalo, P., Lopez, J., Vanbelle, C., Morel, A.-P., Gillet, G., Mikaelian, I., et al. (2011). Antagonistic regulation of EMT by TIF1 $\gamma$  and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep.* *12*, 665–672.

Hoevel, T., Macek, R., Mundigl, O., Swisshelm, K., and Kubbies, M. (2002). Expression and targeting of the tight junction protein CLDN1 in CLDN1-negative human breast tumor cells. *J. Cell. Physiol.* *191*, 60–68.

Horiguchi, K., Sakamoto, K., Koinuma, D., Semba, K., Inoue, A., Inoue, S., Fujii, H., Yamaguchi, A., Miyazawa, K., Miyazono, K., et al. (2012a). TGF- $\beta$  drives epithelial-mesenchymal transition through  $\delta$ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene* *31*, 3190–3201.

Horiguchi, M., Ota, M., and Rifkin, D.B. (2012b). Matrix control of transforming growth factor- $\beta$  function. *J. Biochem. (Tokyo)* *152*, 321–329.

Horiuchi, K., Zhou, H.-M., Kelly, K., Manova, K., and Blobel, C.P. (2005). Evaluation of the contributions of ADAMs 9, 12, 15, 17, and 19 to heart development and ectodomain shedding of neuregulins  $\beta 1$  and  $\beta 2$ . *Dev. Biol.* *283*, 459–471.

Horiuchi, K., Le Gall, S., Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., Toyama, Y., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2007). Substrate selectivity of epidermal growth

factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Mol. Biol. Cell* 18, 176–188.

Hotz, B., Visekruna, A., Buhr, H.-J., and Hotz, H.G. (2009). Beyond Epithelial to Mesenchymal Transition: A Novel Role for the Transcription Factor Snail in Inflammation and Wound Healing. *J. Gastrointest. Surg.* 14, 388–397.

Hougaard, S., Loechel, F., Xu, X., Tajima, R., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (2000). Trafficking of human ADAM 12-L: retention in the trans-Golgi network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 261–267.

Hovhannisyan, R.H., and Carstens, R.P. (2007). Heterogeneous Ribonucleoprotein M Is a Splicing Regulatory Protein That Can Enhance or Silence Splicing of Alternatively Spliced Exons. *J. Biol. Chem.* 282, 36265–36274.

Huang, R.Y.-J., Guilford, P., and Thiery, J.P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 125, 4417–4422.

Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B.J., Loechel, F., and Wewer, U.M. (1999). Cysteine-Rich Domain of Human ADAM 12 (Meltrin  $\alpha$ ) Supports Tumor Cell Adhesion. *Am. J. Pathol.* 154, 1489–1501.

Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B., Fröhlich, C., Loechel, F., Zolkiewska, A., Ishiguro, K., Kojima, T., Liu, W., Langford, J.K., et al. (2000). The Cysteine-Rich Domain of Human Adam 12 Supports Cell Adhesion through Syndecans and Triggers Signaling Events That Lead to  $\beta$ 1 Integrin-Dependent Cell Spreading. *J. Cell Biol.* 149, 1143–1156.

Ieguchi, K., Tomita, T., Omori, T., Komatsu, A., Deguchi, A., Masuda, J., Duffy, S.L., Coulthard, M.G., Boyd, A., and Maru, Y. (2013). ADAM12-cleaved ephrin-A1 contributes to lung metastasis. *Oncogene*.

Ikushima, H., and Miyazono, K. (2011). Biology of Transforming Growth Factor- $\beta$ ; Signaling. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 2099–2107.

Iliopoulos, D., Lindahl-Allen, M., Polytarchou, C., Hirsch, H.A., Tschlis, P.N., and Struhl, K. (2010). Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to Polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells. *Mol. Cell* 39, 761–772.

Illman, S.A., Lehti, K., Keski-Oja, J., and Lohi, J. (2006). Epilysin (MMP-28) induces TGF- $\beta$  mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J. Cell Sci.* 119, 3856–3865.

Inoue, D., Reid, M., Lum, L., Krättschmar, J., Weskamp, G., Myung, Y.M., Baron, R., and Blobel, C.P. (1998). Cloning and Initial Characterization of Mouse Meltrin  $\beta$  and Analysis of the Expression of Four Metalloprotease/Disintegrins in Bone Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 4180–4187.

Irigoyen, M., Pajares, M.J., Agorreta, J., Ponz-Sarvisé, M., Salvo, E., Lozano, M.D., Pío, R., Gil-Bazo, I., and Rouzaut, A. (2010). TGFBI expression is associated with a better response to chemotherapy in NSCLC. *Mol. Cancer* 9, 130.



- Ito, N., Nomura, S., Iwase, A., Ito, T., Kikkawa, F., Tsujimoto, M., Ishiura, S., and Mizutani, S. (2004). ADAMs, a disintegrin and metalloproteinases, mediate shedding of oxytocinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *314*, 1008–1013.
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* *110*, 341–350.
- Jacobsen, J., and Wewer, U.M. (2009). Targeting ADAM12 in human disease: head, body or tail? *Curr. Pharm. Des.* *15*, 2300–2310.
- Jacobsen, J., Visse, R., Sørensen, H.P., Enghild, J.J., Brew, K., Wewer, U.M., and Nagase, H. (2008). Catalytic Properties of ADAM12 and Its Domain Deletion Mutants†. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 537–547.
- Januchowski, R., Zawierucha, P., Ruciński, M., Nowicki, M., and Zabel, M. (2014). Extracellular Matrix Proteins Expression Profiling in Chemoresistant Variants of the A2780 Ovarian Cancer Cell Line. *BioMed Res. Int.* *2014*.
- Jørgensen, L.H., Jensen, C.H., Wewer, U.M., and Schrøder, H.D. (2007). Transgenic Overexpression of ADAM12 Suppresses Muscle Regeneration and Aggravates Dystrophy in Aged mdx Mice. *Am. J. Pathol.* *171*, 1599–1607.
- Ju, W., Ogawa, A., Heyer, J., Nierhof, D., Yu, L., Kucherlapati, R., Shafritz, D.A., and Bottinger, E.P. (2005). Deletion of Smad2 in Mouse Liver Reveals Novel Functions in Hepatocyte Growth and Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 654–667.
- Jung, M.S., Yun, J., Chae, H.D., Kim, J.M., Kim, S.C., Choi, T.S., and Shin, D.Y. (2001). p53 and its homologues, p63 and p73, induce a replicative senescence through inactivation of NF-Y transcription factor. *Oncogene* *20*, 5818–5825.
- Jurica, M.S., and Moore, M.J. (2003). Pre-mRNA Splicing: Awash in a Sea of Proteins. *Mol. Cell* *12*, 5–14.
- Kaimori, A., Potter, J., Kaimori, J., Wang, C., Mezey, E., and Koteish, A. (2007). Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces an Epithelial-to-Mesenchymal Transition State in Mouse Hepatocytes in Vitro. *J. Biol. Chem.* *282*, 22089–22101.
- Kajita, M., McClinic, K.N., and Wade, P.A. (2004). Aberrant Expression of the Transcription Factors Snail and Slug Alters the Response to Genotoxic Stress. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7559–7566.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* *119*, 1420–1428.
- Kang, Q., Cao, Y., and Zolkiewska, A. (2000). Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem. J.* *352 Pt 3*, 883–892.
- Kang, Q., Cao, Y., and Zolkiewska, A. (2001). Direct Interaction between the Cytoplasmic Tail of ADAM 12 and the Src Homology 3 Domain of p85 $\alpha$  Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase in C2C12 Cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 24466–24472.

Kattla, J.J., Carew, R.M., Heljić, M., Godson, C., and Brazil, D.P. (2008). Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF- $\beta$ 1-driven epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 295, F215–F225.

Kawaguchi, N., Xu, X., Tajima, R., Kronqvist, P., Sundberg, C., Loechel, F., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (2002). ADAM 12 Protease Induces Adipogenesis in Transgenic Mice. *Am. J. Pathol.* 160, 1895–1903.

Kawaguchi, N., Sundberg, C., Kveiborg, M., Moghadaszadeh, B., Asmar, M., Dietrich, N., Thodeti, C.K., Nielsen, F.C., Möller, P., Mercurio, A.M., et al. (2003). ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating  $\beta$ 1 integrin function. *J. Cell Sci.* 116, 3893–3904.

Kelly, T., Yan, Y., Osborne, R.L., Athota, A.B., Rozypal, T.L., Colclasure, J.C., and Chu, W.S. (1998). Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases. *Clin. Exp. Metastasis* 16, 501–512.

Kerna, I., Kisand, K., Tamm, A.E., Lintrop, M., Veske, K., and Tamm, A.O. (2009). Missense single nucleotide polymorphism of the ADAM12 gene is associated with radiographic knee osteoarthritis in middle-aged Estonian cohort. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 1093–1098.

Kerna, I., Kisand, K., Laitinen, P., Tamm, A.E., Kumm, J., Lintrop, M., and Tamm, A.O. (2011). Association of ADAM12-S protein with radiographic features of knee osteoarthritis and bone and cartilage markers. *Rheumatol. Int.* 32, 519–523.

Kerna, I., Kisand, K., Suutre, S., Murde, M., Tamm, A., Kumm, J., and Tamm, A. (2014). The ADAM12 is upregulated in synovitis and postinflammatory fibrosis of the synovial membrane in patients with early radiographic osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 81, 51–56.

Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 141, 52–67.

Kim, E.-S., Sohn, Y.-W., and Moon, A. (2007). TGF- $\beta$ -induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells. *Cancer Lett.* 252, 147–156.

Kim, J.-E., Kim, S.-J., Jeong, H.-W., Lee, B.-H., Choi, J.-Y., Park, R.-W., Park, J.Y., and Kim, I.-S. (2003). RGD peptides released from  $\beta$ ig-h3, a TGF- $\beta$ -induced cell-adhesive molecule, mediate apoptosis. *Oncogene* 22, 2045–2053.

Kim, J.J., Khalid, O., Namazi, A., Tu, T.G., Elie, O., Lee, C., and Kim, Y. (2014). Discovery of consensus gene signature and intermodular connectivity defining self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 1468–1479.

Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., and Chapman, H.A. (2006). Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13180–13185.

- Kim, Y., Kugler, M.C., Wei, Y., Kim, K.K., Li, X., Brumwell, A.N., and Chapman, H.A. (2009). Integrin  $\alpha 3\beta 1$ -dependent  $\beta$ -catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. *J. Cell Biol.* *184*, 309–322.
- Kim, Y.M., Kim, J., Heo, S.C., Shin, S.H., Do, E.K., Suh, D.-S., Kim, K.-H., Yoon, M.-S., Lee, T.G., and Kim, J.H. (2012). Proteomic identification of ADAM12 as a regulator for TGF- $\beta 1$ -induced differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle cells. *PLoS One* *7*, e40820.
- Kodama, T., Ikeda, E., Okada, A., Ohtsuka, T., Shimoda, M., Shiomi, T., Yoshida, K., Nakada, M., Ohuchi, E., and Okada, Y. (2004). ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am. J. Pathol.* *165*, 1743–1753.
- Koenig, A., Mueller, C., Hasel, C., Adler, G., and Menke, A. (2006). Collagen Type I Induces Disruption of E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Contacts and Promotes Proliferation of Pancreatic Carcinoma Cells. *Cancer Res.* *66*, 4662–4671.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006). IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* *177*, 566–573.
- Kooistra, M.R.H., Dubé, N., and Bos, J.L. (2007). Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J. Cell Sci.* *120*, 17–22.
- Kornberg, L.J., Villaret, D., Popp, M., Lui, L., McLaren, R., Brown, H., Cohen, D., Yun, J., and McFadden, M. (2005). Gene expression profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity shows abnormalities in several signaling pathways. *The Laryngoscope* *115*, 690–698.
- Koseki, T., Gao, Y., Okahashi, N., Murase, Y., Tsujisawa, T., Sato, T., Yamato, K., and Nishihara, T. (2002). Role of TGF- $\beta$  family in osteoclastogenesis induced by RANKL. *Cell. Signal.* *14*, 31–36.
- Kronqvist, P., Kawaguchi, N., Albrechtsen, R., Xu, X., Schröder, H.D., Moghadaszadeh, B., Nielsen, F.C., Fröhlich, C., Engvall, E., and Wewer, U.M. (2002). ADAM12 Alleviates the Skeletal Muscle Pathology in mdx Dystrophic Mice. *Am. J. Pathol.* *161*, 1535–1540.
- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T., and Kawakami, Y. (2009). Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* *15*, 195–206.
- Kumar, P., Mukherjee, M., Johnson, J.P.S., Patel, M., Huey, B., Albertson, D.G., and Simin, K. (2012). Cooperativity of Rb, Brca1, and p53 in Malignant Breast Cancer Evolution. *PLoS Genet* *8*, e1003027.
- Kurisaki, T., Masuda, A., Osumi, N., Nabeshima, Y., and Fujisawa-Sehara, A. (1998). Spatially- and temporally-restricted expression of meltrin  $\alpha$  (ADAM12) and  $\beta$  (ADAM19) in mouse embryo. *Mech. Dev.* *73*, 211–215.
- Kurisaki, T., Masuda, A., Sudo, K., Sakagami, J., Higashiyama, S., Matsuda, Y., Nagabukuro, A., Tsuji, A., Nabeshima, Y., Asano, M., et al. (2003). Phenotypic Analysis of Meltrin  $\alpha$

(ADAM12)-Deficient Mice: Involvement of Meltrin  $\alpha$  in Adipogenesis and Myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23, 55–61.

Kuzmanov, A., Hopfer, U., Marti, P., Meyer-Schaller, N., Yilmaz, M., and Christofori, G. (2014). LIM-homeobox gene 2 promotes tumor growth and metastasis by inducing autocrine and paracrine PDGF-B signaling. *Mol. Oncol.* 8, 401–416.

Kveiborg, M., Fröhlich, C., Albrechtsen, R., Tischler, V., Dietrich, N., Holck, P., Kronqvist, P., Rank, F., Mercurio, A.M., and Wewer, U.M. (2005). A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. *Cancer Res.* 65, 4754–4761.

Kveiborg, M., Albrechtsen, R., Rudkjær, L., Wen, G., Damgaard-Pedersen, K., and Wewer, U.M. (2006). ADAM12-S Stimulates Bone Growth in Transgenic Mice by Modulating Chondrocyte Proliferation and Maturation. *J. Bone Miner. Res.* 21, 1288–1296.

Kveiborg, M., Albrechtsen, R., Couchman, J.R., and Wewer, U.M. (2008). Cellular roles of ADAM12 in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1685–1702.

Labelle, M., Begum, S., and Hynes, R.O. (2011). Direct Signaling Between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* 20, 576–590.

Lafuste, P., Sonnet, C., Chazaud, B., Dreyfus, P.A., Gherardi, R.K., Wewer, U.M., and Authier, F.-J. (2005). ADAM12 and  $\alpha 9\beta 1$  integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation. *Mol. Biol. Cell* 16, 861–870.

Laigaard, J., Sørensen, T., Fröhlich, C., Pedersen, B.N., Christiansen, M., Schiøtt, K., Uldbjerg, N., Albrechtsen, R., Clausen, H.V., Ottesen, B., et al. (2003). ADAM12: a novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 23, 1086–1091.

Laigaard, J., Christiansen, M., Fröhlich, C., Pedersen, B.N., Ottesen, B., and Wewer, U.M. (2005a). The level of ADAM12-S in maternal serum is an early first-trimester marker of fetal trisomy 18. *Prenat. Diagn.* 25, 45–46.

Laigaard, J., Sørensen, T., Placing, S., Holck, P., Fröhlich, C., Wøjdemann, K.R., Sundberg, K., Shalmi, A.-C., Tabor, A., Nørgaard-Pedersen, B., et al. (2005b). Reduction of the disintegrin and metalloprotease ADAM12 in preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 106, 144–149.

Laigaard, J., Spencer, K., Christiansen, M., Cowans, N.J., Larsen, S.O., Pedersen, B.N., and Wewer, U.M. (2006). ADAM 12 as a first-trimester maternal serum marker in screening for Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 26, 973–979.

Lamouille, S., and Derynck, R. (2007). Cell size and invasion in TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* 178, 437–451.

Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648.

Lapuk, A., Marr, H., Jakkula, L., Pedro, H., Bhattacharya, S., Purdom, E., Hu, Z., Simpson, K., Pachter, L., Durinck, S., et al. (2010). Exon-level microarray analyses identify alternative splicing programs in breast cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 961–974.

Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M., and Derynck, R. (2007). TGF- $\beta$  activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* 26, 3957–3967.

Lee, S.-H., Lee, S.-J., Jung, Y.S., Xu, Y., Kang, H.S., Ha, N.-C., and Park, B.-J. (2009). Blocking of p53-Snail Binding, Promoted by Oncogenic K-Ras, Recovers p53 Expression and Function,. *Neoplasia N. Y. N* 11, 22–31.

Lehmann, K., Janda, E., Pierreux, C.E., Rytömaa, M., Schulze, A., McMahon, M., Hill, C.S., Beug, H., and Downward, J. (2000). Raf induces TGF $\beta$  production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev.* 14, 2610–2622.

Lendeckel, U., Kohl, J., Arndt, M., Carl-McGrath, S., Donat, H., and Röcken, C. (2004). Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131, 41–48.

Leonard, J.D., Lin, F., and Milla, M.E. (2005). Chaperone-like properties of the prodomain of TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE) and the functional role of its cysteine switch. *Biochem. J.* 387, 797.

Leyme, A., Bourd-Boittin, K., Bonnier, D., Falconer, A., Arlot-Bonnemains, Y., and Thérêt, N. (2012). Identification of ILK as a new partner of the ADAM12 disintegrin and metalloprotease in cell adhesion and survival. *Mol. Biol. Cell* 23, 3461–3472.

Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Cañamero, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2009a). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 460, 1136–1139.

Li, H., Solomon, E., Duhachek Muggy, S., Sun, D., and Zolkiewska, A. (2011). Metalloprotease-disintegrin ADAM12 expression is regulated by Notch signaling via microRNA-29. *J. Biol. Chem.* 286, 21500–21510.

Li, H., Duhachek-Muggy, S., Qi, Y., Hong, Y., Behbod, F., and Zolkiewska, A. (2012). An essential role of metalloprotease-disintegrin ADAM12 in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 135, 759–769.

Li, H., Duhachek-Muggy, S., Dubnicka, S., and Zolkiewska, A. (2013). Metalloproteinase-disintegrin ADAM12 is associated with a breast tumor-initiating cell phenotype. *Breast Cancer Res. Treat.*

Li, Q.-Q., Xu, J.-D., Wang, W.-J., Cao, X.-X., Chen, Q., Tang, F., Chen, Z.-Q., Liu, X.-P., and Xu, Z.-D. (2009b). Twist1-Mediated Adriamycin-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Relates to Multidrug Resistance and Invasive Potential in Breast Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 15, 2657–2665.

- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., et al. (2008). Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 672–679.
- Li, Y., Yang, J., Dai, C., Wu, C., and Liu, Y. (2003). Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J. Clin. Invest.* 112, 503–516.
- Liang, X., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Bornmann, W., Tempst, P., and Resh, M.D. (2001). Heterogeneous Fatty Acylation of Src Family Kinases with Polyunsaturated Fatty Acids Regulates Raft Localization and Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 276, 30987–30994.
- Liebner, S., Cattelino, A., Gallini, R., Rudini, N., Iurlaro, M., Piccolo, S., and Dejana, E. (2004).  $\beta$ -Catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J. Cell Biol.* 166, 359–367.
- Liu, S., Kumar, S.M., Lu, H., Liu, A., Yang, R., Pushparajan, A., Guo, W., and Xu, X. (2012). MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF- $\kappa$ B1-Snail1 pathway in melanoma. *J. Pathol.* 226, 61–72.
- Loechel, F., Gilpin, B.J., Engvall, E., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (1998). Human ADAM 12 (Meltrin  $\alpha$ ) Is an Active Metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 273, 16993–16997.
- Loechel, F., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (1999). Regulation of Human ADAM 12 Protease by the Prodomain EVIDENCE FOR A FUNCTIONAL CYSTEINE SWITCH. *J. Biol. Chem.* 274, 13427–13433.
- Loechel, F., Fox, J.W., Murphy, G., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (2000). ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 511–515.
- Lu, X., and Kang, Y. (2011). Cell fusion hypothesis of the cancer stem cell. *Adv. Exp. Med. Biol.* 714, 129–140.
- Ma, G., Ainola, M., Liljeström, M., Santavirta, S., Poduval, P., Zhao, D., Chen, T., and Kontinen, Y.T. (2005). Increased expression and processing of ADAM 12 (meltrin- $\alpha$ ) in osteolysis associated with aseptic loosening of total hip replacement implants. *J. Rheumatol.* 32, 1943–1950.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., Teruya-Feldstein, J., Reinhardt, F., Onder, T.T., Valastyan, S., et al. (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 12, 247–256.
- Mack, G.S. (2007). MicroRNA gets down to business. *Nat. Biotechnol.* 25, 631–638.
- Mack, M., and Yanagita, M. (2015). Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int.* 87, 297–307.
- Maeda, M., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (2005). Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J. Cell Sci.* 118, 873–887.

- Maestro, R., Tos, A.P.D., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H., and Hannon, G.J. (1999). twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* *13*, 2207–2217.
- Magenta, A., Cencioni, C., Fasanaro, P., Zaccagnini, G., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Antonini, A., Martelli, F., and Capogrossi, M.C. (2011). miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. *Cell Death Differ.* *18*, 1628–1639.
- Malinin, N.L., Wright, S., Seubert, P., Schenk, D., and Griswold-Prenner, I. (2005). Amyloid- $\beta$  neurotoxicity is mediated by FISH adapter protein and ADAM12 metalloprotease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3058–3063.
- Maniati, E., Soper, R., and Hagemann, T. (2010). Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene* *29*, 5653–5662.
- Marchetti, A., Colletti, M., Cozzolino, A.M., Steindler, C., Lunadei, M., Mancone, C., and Tripodi, M. (2008). ERK5/MAPK is activated by TGF $\beta$  in hepatocytes and required for the GSK-3 $\beta$ -mediated Snail protein stabilization. *Cell. Signal.* *20*, 2113–2118.
- Martin, T.A., Mansel, R.E., and Jiang, W.G. (2002). Antagonistic effect of NK4 on HGF/SF induced changes in the transendothelial resistance (TER) and paracellular permeability of human vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* *192*, 268–275.
- Maruyama, R., Choudhury, S., Kowalczyk, A., Bessarabova, M., Beresford-Smith, B., Conway, T., Kaspi, A., Wu, Z., Nikolskaya, T., Merino, V.F., et al. (2011). Epigenetic Regulation of Cell Type-Specific Expression Patterns in the Human Mammary Epithelium. *PLoS Genet.* *7*.
- Masaki, M., Kurisaki, T., Shirakawa, K., and Sehara-Fujisawa, A. (2005). Role of meltrin { $\alpha$ } (ADAM12) in obesity induced by high- fat diet. *Endocrinology* *146*, 1752–1763.
- Maschler, S., Wirl, G., Spring, H., Bredow, D. v, Sordat, I., Beug, H., and Reichmann, E. (2005). Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene* *24*, 2032–2041.
- Massagué, J. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 616–630.
- McCaughan, F., Pole, J.C.M., Bankier, A.T., Konfortov, B.A., Carroll, B., Falzon, M., Rabbitts, T.H., George, P.J., Dear, P.H., and Rabbitts, P.H. (2010). Progressive 3q Amplification Consistently Targets SOX2 in Preinvasive Squamous Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *182*, 83–91.
- Mehrotra, S., Languino, L.R., Raskett, C.M., Mercurio, A.M., Dohi, T., and Altieri, D.C. (2010). IAP REGULATION OF METASTASIS. *Cancer Cell* *17*, 53.
- Mendez, M.G., Kojima, S.-I., and Goldman, R.D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* *24*, 1838–1851.
- Meng, X.-M., Tang, P.M.-K., Li, J., and Lan, H.Y. (2015). TGF- $\beta$ /Smad signaling in renal fibrosis. *Front. Physiol.* *6*.

- Miura, K., Higashijima, A., Miura, S., Mishima, H., Yamasaki, K., Abe, S., Hasegawa, Y., Kaneuchi, M., Yoshida, A., Kinoshita, A., et al. (2014). Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin–twin transfusion syndrome. *Prenat. Diagn.* 34, 345–349.
- Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A., and Matsuda, M. (2001). Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411, 1065–1068.
- Moghadaszadeh, B., Albrechtsen, R., Guo, L.T., Zaik, M., Kawaguchi, N., Borup, R.H., Kronqvist, P., Schröder, H.D., Davies, K.E., Voit, T., et al. (2003). Compensation for dystrophin-deficiency: ADAM12 overexpression in skeletal muscle results in increased  $\alpha 7$  integrin, utrophin and associated glycoproteins. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2467–2479.
- Moon, M.-Y., Kim, H.-J., Kim, J.-G., Lee, J.-Y., Kim, J., Kim, S.-C., Choi, I.-G., Kim, P.-H., and Park, J.-B. (2013). Small GTPase Rap1 regulates cell migration through regulation of small GTPase RhoA activity in response to transforming growth factor- $\beta 1$ . *J. Cell. Physiol.* 228, 2119–2126.
- Mori, S., Tanaka, M., Nanba, D., Nishiwaki, E., Ishiguro, H., Higashiyama, S., and Matsuura, N. (2003). PACSIN3 binds ADAM12/meltrin alpha and up-regulates ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J. Biol. Chem.* 278, 46029–46034.
- Moss, M.L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P.M., Gillispie, P.A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J.W., et al. (2007). The ADAM10 Prodomain Is a Specific Inhibitor of ADAM10 Proteolytic Activity and Inhibits Cellular Shedding Events. *J. Biol. Chem.* 282, 35712–35721.
- Muraoka, R.S., Koh, Y., Roebuck, L.R., Sanders, M.E., Brantley-Sieders, D., Gorska, A.E., Moses, H.L., and Arteaga, C.L. (2003). Increased Malignancy of Neu-Induced Mammary Tumors Overexpressing Active Transforming Growth Factor  $\beta 1$ . *Mol. Cell. Biol.* 23, 8691–8703.
- Murphy, G. (2008). The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer* 8, 932–941.
- Murray, S.A., and Gridley, T. (2006). Snail family genes are required for left–right asymmetry determination, but not neural crest formation, in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10300–10304.
- Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.-J., Arsanto, J.-P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., et al. (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 24, 4330–4339.
- Nawshad, A., Medici, D., Liu, C.-C., and Hay, E.D. (2007). TGF $\beta 3$  inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex. *J. Cell Sci.* 120, 1646–1653.



- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515–527.
- Nieto, M.A. (2011). The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 347–376.
- Nieto, M.A., Sargent, M.G., Wilkinson, D.G., and Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835–839.
- Nilsen, T.W., and Graveley, B.R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463, 457–463.
- Nisticò, P., Bissell, M.J., and Radisky, D.C. (2012). Epithelial-Mesenchymal Transition: General Principles and Pathological Relevance with Special Emphasis on the Role of Matrix Metalloproteinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011908.
- O’Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106–110.
- Ocaña, O.H., Córcoles, R., Fabra, Á., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A., and Nieto, M.A. (2012). Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell* 22, 709–724.
- Oft, M., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2002). Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat. Cell Biol.* 4, 487–494.
- Ohashi, S., Natsuzaka, M., Wong, G.S., Michaylira, C.Z., Grugan, K.D., Stairs, D.B., Kalabis, J., Vega, M.E., Kalman, R.A., Nakagawa, M., et al. (2010). Epidermal Growth Factor Receptor and Mutant p53 Expand an Esophageal Cellular Subpopulation Capable of Epithelial-to-Mesenchymal Transition through ZEB Transcription Factors. *Cancer Res.* 70, 4174–4184.
- Okada, A., Mochizuki, S., Yatabe, T., Kimura, T., Shiomi, T., Fujita, Y., Matsumoto, H., Sehara-Fujisawa, A., Iwamoto, Y., and Okada, Y. (2008). ADAM-12 (meltrin  $\alpha$ ) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor binding protein 5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 58, 778–789.
- Okada, T., Sinha, S., Esposito, I., Schiavon, G., López-Lago, M.A., Su, W., Pratilas, C.A., Abele, C., Hernandez, J.M., Ohara, M., et al. (2015). The Rho GTPase Rnd1 suppresses mammary tumorigenesis and EMT by restraining Ras-MAPK signalling. *Nat. Cell Biol.* 17, 81–94.
- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Res.* 68, 3645–3654.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF $\beta$  Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity. *Science* 307, 1603–1609.

- Le Pabic, H., Bonnier, D., Wewer, U.M., Coutand, A., Musso, O., Baffet, G., Clément, B., and Thérét, N. (2003). ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. *Hepatology*. Baltimore, Md 37, 1056–1066.
- Le Pabic, H., L'Helgoualc'h, A., Coutant, A., Wewer, U.M., Baffet, G., Clément, B., and Thérét, N. (2005). Involvement of the serine/threonine p70S6 kinase in TGF-beta1-induced ADAM12 expression in cultured human hepatic stellate cells. *J. Hepatology*. 43, 1038–1044.
- Paňková, K., Rösel, D., Novotný, M., and Brábek, J. (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 63–71.
- Pardal, R., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 895–902.
- Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* 13, 271–282.
- Pattabiraman, D.R., and Weinberg, R.A. (2014). Tackling the cancer stem cells — what challenges do they pose? *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 497–512.
- Pawelek, J.M. (2014). Fusion of bone marrow-derived cells with cancer cells: metastasis as a secondary disease in cancer. *Chin. J. Cancer* 33, 133–139.
- Peduto, L., Reuter, V.E., Sehara-Fujisawa, A., Shaffer, D.R., Scher, H.I., and Blobel, C.P. (2006). ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for mouse prostate tumor progression. *Oncogene* 25, 5462–5466.
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Gnidehou, S., Grynberg, M., Geneau, G., Guibourdenche, J., Carette, D., Cronier, L., Evain-Brion, D., Malassiné, A., et al. (2010). ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 298, C1517–C1526.
- Pick, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C.H., and Dijke, P. ten (1999). TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J. Cell Sci.* 112, 4557–4568.
- Pon, Y.L., Zhou, H.Y., Cheung, A.N.Y., Ngan, H.Y.S., and Wong, A.S.T. (2008). p70 S6 Kinase Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition through Snail Induction in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res.* 68, 6524–6532.
- Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J., and Kroll, K.L. (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J.* 22, 2453–2462.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2009). Mammary development meets cancer genomics. *Nat. Med.* 15, 842–844.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* 5, 5–23.

Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* 12, R68.

Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S., and Ansieau, S. (2005). A twist for survival and cancer progression. *Br. J. Cancer* 94, 13–17.

Qi, Y., Duhachek-Muggy, S., Li, H., and Zolkiewska, A. (2014). Phenotypic Diversity of Breast Cancer-Related Mutations in Metalloproteinase-Disintegrin ADAM12. *PLoS ONE* 9, e92536.

Quail, D., and Joyce, J. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19, 1423–1437.

Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Nieto, M.A., et al. (2005). Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123–127.

Rao, V.H., Kandel, A., Lynch, D., Pena, Z., Marwaha, N., Deng, C., Watson, P., and Hansen, L.A. (2012). A positive feedback loop between HER2 and ADAM12 in human head and neck cancer cells increases migration and invasion. *Oncogene* 31, 2888–2898.

Rao, V.H., Vogel, K., Yanagida, J.K., Marwaha, N., Kandel, A., Trempus, C., Repertinger, S.K., and Hansen, L.A. (2014). Erbb2 up-regulation of ADAM12 expression accelerates skin cancer progression. *Mol. Carcinog.* n/a – n/a.

Ray, A., Dhar, S., and Ray, B.K. (2010). Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Mediated Activation of NF- $\kappa$ B Contributes to Enhanced ADAM-12 Expression in Mammary Carcinoma Cells. *Mol. Cancer Res.* 8, 1261–1270.

Ray, B.K., Dhar, S., Shakya, A., and Ray, A. (2011). Z-DNA-forming silencer in the first exon regulates human ADAM-12 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 103–108.

Ray, B.K., Dhar, S., Henry, C.J., Rich, A., and Ray, A. (2012). Epigenetic Regulation by Z-DNA Silencer Function Controls Cancer-Associated ADAM-12 Expression in Breast Cancer: Cross Talk between MECP2 and NFI transcription factor family. *Cancer Res.*

Reichert, M., Müller, T., and Hunziker, W. (2000). The PDZ Domains of Zonula Occludens-1 Induce an Epithelial to Mesenchymal Transition of Madin-Darby Canine Kidney I Cells EVIDENCE FOR A ROLE OF  $\beta$ -CATENIN/Tcf/Lef SIGNALING. *J. Biol. Chem.* 275, 9492–9500.

Ren, J., Hamada, J., Takeichi, N., Fujikawa, S., and Kobayashi, H. (1990). Ultrastructural differences in junctional intercellular communication between highly and weakly metastatic clones derived from rat mammary carcinoma. *Cancer Res.* 50, 358–362.

Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McCallister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349–361.

- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111–115.
- Rocks, N., Paulissen, G., Quesada Calvo, F., Polette, M., Gueders, M., Munaut, C., Foidart, J.-M., Noel, A., Birembaut, P., and Cataldo, D. (2006). Expression of a disintegrin and metalloprotease (ADAM and ADAMTS) enzymes in human non-small-cell lung carcinomas (NSCLC). *Br. J. Cancer* 94, 724–730.
- Rocks, N., Estrella, C., Paulissen, G., Quesada-Calvo, F., Gilles, C., Guéders, M.M., Crahay, C., Foidart, J.-M., Gosset, P., Noel, A., et al. (2008). The metalloproteinase ADAM-12 regulates bronchial epithelial cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif.* 41, 988–1001.
- Rouleau-Dubois, C., Cuny, M., Ferrieres, G., Simony-Lafontaine, J., Rouanet, P., Grenier, J., Jeanteur, P., Baldet, P., and Escot, C. (2004). Spontaneous Apoptosis in the Intra-Ductal Component's Stroma of Breast Invasive Carcinoma. *Anticancer Res.* 24, 53–58.
- Roy, C.L., and Wrana, J.L. (2004). Cell biology: An unexpected social servant. *Nature* 431, 142–142.
- Roy, R., and Moses, M.A. (2012). ADAM12 induces estrogen-independence in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 131, 731–741.
- Roy, R., Wewer, U.M., Zurakowski, D., Pories, S.E., and Moses, M.A. (2004). ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *J. Biol. Chem.* 279, 51323–51330.
- Roy, R., Rodig, S., Bielenberg, D., Zurakowski, D., and Moses, M.A. (2011). ADAM12 transmembrane and secreted isoforms promote breast tumor growth: a distinct role for ADAM12-S protein in tumor metastasis. *J. Biol. Chem.* 286, 20758–20768.
- Le Roy, C., and Wrana, J.L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 112–126.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 164, 769–779.
- Saika, S., Ikeda, K., Yamanaka, O., Sato, M., Muragaki, Y., Ohnishi, Y., Ooshima, A., Nakajima, Y., Namikawa, K., Kiyama, H., et al. (2004). Transient adenoviral gene transfer of Smad7 prevents injury-induced epithelial–mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Lab. Invest.* 84, 1259–1270.
- Sánchez-Tilló, E., Lázaro, A., Torrent, R., Cuatrecasas, M., Vaquero, E.C., Castells, A., Engel, P., and Postigo, A. (2010). ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* 29, 3490–3500.
- Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A.B., and Ooshima, A. (2003). Targeted disruption of TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest.* 112, 1486–1494.

Sayan, A.E., Griffiths, T.R., Pal, R., Browne, G.J., Ruddick, A., Yagci, T., Edwards, R., Mayer, N.J., Qazi, H., Goyal, S., et al. (2009). SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14884–14889.

Scaffidi, A.K., Petrovic, N., Moodley, Y.P., Fogel-Petrovic, M., Kroeger, K.M., Seeber, R.M., Eidne, K.A., Thompson, P.J., and Knight, D.A. (2004).  $\alpha v\beta 3$  Integrin Interacts with the Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Type II Receptor to Potentiate the Proliferative Effects of TGF $\beta 1$  in Living Human Lung Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *279*, 37726–37733.

Scheel, C., and Weinberg, R.A. (2012). Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Semin. Cancer Biol.* *22*, 396–403.

Scheel, C., Eaton, E.N., Li, S.H.-J., Chaffer, C.L., Reinhardt, F., Kah, K.-J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A.L., et al. (2011). Paracrine and Autocrine Signals Induce and Maintain Mesenchymal and Stem Cell States in the Breast. *Cell* *145*, 926–940.

Schmidt, C.R., Gi, Y.J., Patel, T.A., Coffey, R.J., Beauchamp, R.D., and Pearson, A.S. (2005). E-cadherin is regulated by the transcriptional repressor SLUG during Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells. *Surgery* *138*, 306–312.

Selvais, C., D’Auria, L., Tyteca, D., Perrot, G., Lemoine, P., Troeberg, L., Dedieu, S., Noël, A., Nagase, H., Henriët, P., et al. (2011). Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. *FASEB J.* *25*, 2770–2781.

Serrano, I., McDonald, P.C., Lock, F.E., and Dedhar, S. (2013). Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGF $\beta$ -1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Oncogene* *32*, 50–60.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593–602.

Shapiro, I.M., Cheng, A.W., Flytzanis, N.C., Balsamo, M., Condeelis, J.S., Oktay, M.H., Burge, C.B., and Gertler, F.B. (2011). An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS Genet.* *7*, e1002218.

Sharma, S.V., and Settleman, J. (2007). Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev.* *21*, 3214–3231.

Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* *113*, 685–700.

Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., and Springer, T.A. (2011). Latent TGF- $\beta$  structure and activation. *Nature* *474*, 343–349.

Shi, Z., Xu, W., Loechel, F., Wewer, U.M., and Murphy, L.J. (2000). ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. *J. Biol. Chem.* *275*, 18574–18580.

Shimura, T., Dagher, A., Sachdev, M., Ebi, M., Yamada, T., Yamada, T., Joh, T., and Moses, M.A. (2015). Urinary ADAM12 and MMP-9/NGAL complex detect the presence of gastric cancer. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 8, 240–248.

Shin, S.H., Kim, J., Heo, S.C., Kwon, Y.W., Kim, Y.M., Kim, I.-S., Lee, T.G., and Kim, J.H. (2012). Proteomic Identification of Betaig-h3 as a Lysophosphatidic Acid-Induced Secreted Protein of Human Mesenchymal Stem Cells: Paracrine Activation of A549 Lung Adenocarcinoma Cells by Betaig-h3. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11.

Shintani, Y., Maeda, M., Chaika, N., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (2008). Collagen I Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells via Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38, 95–104.

Shipitsin, M., and Polyak, K. (2008). The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab. Invest.* 88, 459–463.

Singh, A., and Settleman, J. (2009). Oncogenic K-ras “addiction” and synthetic lethality. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 2676–2677.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.

Skonier, J., Neubauer, M., Madisen, L., Bennett, K., Plowman, G.D., and Purchio, A.F. (1992). cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol.* 11, 511–522.

Solomon, E., Li, H., Duhachek Muggy, S., Syta, E., and Zolkiewska, A. (2010). The role of SnoN in transforming growth factor beta1-induced expression of metalloprotease-disintegrin ADAM12. *J. Biol. Chem.* 285, 21969–21977.

Sørensen, H.P., Vivès, R.R., Manetopoulos, C., Albrechtsen, R., Lydolph, M.C., Jacobsen, J., Couchman, J.R., and Wewer, U.M. (2008). Heparan Sulfate Regulates ADAM12 through a Molecular Switch Mechanism. *J. Biol. Chem.* 283, 31920–31932.

Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.-H., and Landström, M. (2008). The type I TGF- $\beta$  receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat. Cell Biol.* 10, 1199–1207.

D’Souza, R.C.J., Knittle, A.M., Nagaraj, N., van Dinther, M., Choudhary, C., Dijke, P. ten, Mann, M., and Sharma, K. (2014). Time-resolved dissection of early phosphoproteome and ensuing proteome changes in response to TGF- $\beta$ . *Sci. Signal.* 7, rs5–rs5.

Spano, D., Heck, C., De Antonellis, P., Christofori, G., and Zollo, M. (2012). Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 22, 234–249.

Sporn, M.B. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377–1381.

Stautz, D., Sanjay, A., Hansen, M.T., Albrechtsen, R., Wewer, U.M., and Kveiborg, M. (2010). ADAM12 localizes with c-Src to actin-rich structures at the cell periphery and regulates Src kinase activity. *Exp. Cell Res.* 316, 55–67.

Stautz, D., Leyme, A., Grandal, M.V., Albrechtsen, R., van Deurs, B., Wewer, U., and Kveiborg, M. (2012a). Cell-surface Metalloprotease ADAM12 is Internalized by a Clathrin- and Grb2-dependent Mechanism. *Traffic* n/a – n/a.

Stautz, D., Wewer, U.M., and Kveiborg, M. (2012b). Functional analysis of a breast cancer-associated mutation in the intracellular domain of the metalloprotease ADAM12. *PloS One* 7, e37628.

Stewart, T.A., Azimi, I., Thompson, E.W., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2015). A role for calcium in the regulation of ATP-binding cassette, sub-family C, member 3 (ABCC3) gene expression in a model of epidermal growth factor-mediated breast cancer epithelial–mesenchymal transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 509–514.

St Johnston, D., and Ahringer, J. (2010). Cell Polarity in Eggs and Epithelia: Parallels and Diversity. *Cell* 141, 757–774.

Sun, D., Li, H., and Zolkiewska, A. (2008). The Role of Delta-like 1 Shedding in Muscle Cell Self-Renewal and Differentiation. *J. Cell Sci.* 121, 3815–3823.

Sundberg, C., Thodeti, C.K., Kveiborg, M., Larsson, C., Parker, P., Albrechtsen, R., and Wewer, U.M. (2004). Regulation of ADAM12 cell-surface expression by protein kinase C epsilon. *J. Biol. Chem.* 279, 51601–51611.

Suzuki, A., Kadota, N., Hara, T., Nakagami, Y., Izumi, T., Takenawa, T., Sabe, H., and Endo, T. (2000). Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. *Oncogene* 19, 5842–5850.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.

Takano, S., Kanai, F., Jazag, A., Ijichi, H., Yao, J., Ogawa, H., Enomoto, N., Omata, M., and Nakao, A. (2007). Smad4 is Essential for Down-regulation of E-cadherin Induced by TGF- $\beta$  in Pancreatic Cancer Cell Line PANC-1. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 345–351.

Tam, W.L., and Weinberg, R.A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* 19, 1438–1449.

Tan, X., Li, Y., and Liu, Y. (2006). Paricalcitol Attenuates Renal Interstitial Fibrosis in Obstructive Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 3382–3393.

Tanaka, M., Nanba, D., Mori, S., Shiba, F., Ishiguro, H., Yoshino, K., Matsuura, N., and Higashiyama, S. (2004). ADAM Binding Protein Eve-1 Is Required for Ectodomain Shedding of Epidermal Growth Factor Receptor Ligands. *J. Biol. Chem.* 279, 41950–41959.

Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T., Gupta, P.B., Evans, K.W., et al. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15449–15454.

Testoni, B., Borrelli, S., Tenedini, E., Alotto, D., Castagnoli, C., Piccolo, S., Tagliafico, E., Ferrari, S., Viganò, M.A., and Mantovani, R. (2006). Identification of new p63 targets in human keratinocytes. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 2805–2811.

Thapa, N., Lee, B.-H., and Kim, I.-S. (2007). TGFBIp/ $\beta$ ig-h3 protein: A versatile matrix molecule induced by TGF- $\beta$ . *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 2183–2194.

Theveneau, E., and Mayor, R. (2012). Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 677–684.

Thodeti, C.K., Albrechtsen, R., Grauslund, M., Asmar, M., Larsson, C., Takada, Y., Mercurio, A.M., Couchman, J.R., and Wewer, U.M. (2003). ADAM12/syndecan-4 signaling promotes beta 1 integrin-dependent cell spreading through protein kinase Calpha and RhoA. *J. Biol. Chem.* 278, 9576–9584.

Thodeti, C.K., Fröhlich, C., Nielsen, C.K., Holck, P., Sundberg, C., Kveiborg, M., Mahalingam, Y., Albrechtsen, R., Couchman, J.R., and Wewer, U.M. (2005). Hierarchy of ADAM12 binding to integrins in tumor cells. *Exp. Cell Res.* 309, 438–450.

Tian, B.L., Wen, J.M., Zhang, M., Xie, D., Xu, R.B., and Luo, C.J. (2002). The expression of ADAM12 (meltrin  $\alpha$ ) in human giant cell tumours of bone. *Mol. Pathol.* 55, 394–397.

Tian, M., Neil, J.R., and Schiemann, W.P. (2011). Transforming Growth Factor- $\beta$  and the Hallmarks of Cancer. *Cell. Signal.* 23, 951–962.

Tiwari, N., Tiwari, V.K., Waldmeier, L., Balwierz, P.J., Arnold, P., Pachkov, M., Meyer-Schaller, N., Schübeler, D., van Nimwegen, E., and Christofori, G. (2013). Sox4 Is a Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition by Controlling Ezh2 Expression and Epigenetic Reprogramming. *Cancer Cell* 23, 768–783.

Toft-Hansen, H., Nuttall, R.K., Edwards, D.R., and Owens, T. (2004). Key Metalloproteinases Are Expressed by Specific Cell Types in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 173, 5209–5218.

Toivola, D.M., Tao, G.-Z., Habtezion, A., Liao, J., and Omary, M.B. (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* 15, 608–617.

Trimboli, A.J., Fukino, K., Bruin, A. de, Wei, G., Shen, L., Tanner, S.M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson, M.L., Eng, C., et al. (2008). Direct Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transitions in Breast Cancer. *Cancer Res.* 68, 937–945.

Truong, H.H., Xiong, J., Ghotra, V.P.S., Nirmala, E., Haazen, L., Dévédec, S.E.L., Balcioglu, H.E., He, S., Snaar-Jagalska, B.E., Vreugdenhil, E., et al. (2014).  $\beta$ 1 Integrin Inhibition Elicits a Prometastatic Switch Through the TGF $\beta$ -miR-200-ZEB Network in E-Cadherin-Positive Triple-Negative Breast Cancer. *Sci. Signal.* 7, ra15–ra15.

Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S., and Yang, J. (2012). Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. *Cancer Cell* 22, 725–736.

Tsou, S.-H., Chen, T.-M., Hsiao, H.-T., and Chen, Y.-H. (2015). A Critical Dose of Doxorubicin Is Required to Alter the Gene Expression Profiles in MCF-7 Cells Acquiring Multidrug Resistance. *PLoS ONE* 10.



- Tsuji, T., Ibaragi, S., Shima, K., Hu, M.G., Katsurano, M., Sasaki, A., and Hu, G. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Growth Suppressor p12CDK2-AP1 Promotes Tumor Cell Local Invasion but Suppresses Distant Colony Growth. *Cancer Res.* 68, 10377–10386.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell* 126, 741–754.
- Utikal, J., Polo, J.M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R.M., Khalil, A., Rheinwald, J.G., and Hochedlinger, K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460, 1145–1148.
- Utoguchi, N., Mizuguchi, H., Dantakean, A., Makimoto, H., Wakai, Y., Tsutsumi, Y., Nakagawa, S., and Mayumi, T. (1996). Effect of tumour cell-conditioned medium on endothelial macromolecular permeability and its correlation with collagen. *Br. J. Cancer* 73, 24–28.
- Uttamsingh, S., Bao, X., Nguyen, K.T., Bhanot, M., Gong, J., Chan, J.L.-K., Liu, F., Chu, T.T., and Wang, L.-H. (2007). Synergistic effect between EGF and TGF- $\beta$ 1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 27, 2626–2634.
- Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* 147, 275–292.
- Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2005). TGF- $\beta$  and the Smad Signaling Pathway Support Transcriptomic Reprogramming during Epithelial-Mesenchymal Cell Transition. *Mol. Biol. Cell* 16, 1987–2002.
- Valdes, A.M., Hart, D.J., Jones, K.A., Surdulescu, G., Swarbrick, P., Doyle, D.V., Schafer, A.J., and Spector, T.D. (2004). Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 2497–2507.
- Valdes, A.M., Van Oene, M., Hart, D.J., Surdulescu, G.L., Loughlin, J., Doherty, M., and Spector, T.D. (2006). Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum.* 54, 533–539.
- Valdés, F., Álvarez, A.M., Locascio, A., Vega, S., Herrera, B., Fernández, M., Benito, M., Nieto, M.A., and Fabregat, I. (2002). The Epithelial Mesenchymal Transition Confers Resistance to the Apoptotic Effects of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Fetal Rat Hepatocytes11 Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (FIS01/0797 to I.F. and FIS01/0985 to M.A.N.) and Comunidad de Madrid, Spain (CAM-08.1/0078/2000 to I.F. and 08.1/0044/2000 to M.A.N.). B. Herrera and A. Locascio were the recipients of fellowships from the Ministerio de Educación y Cultura, Spain and S. Vega from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain. *Mol. Cancer Res.* 1, 68–78.
- Vardouli, L., Moustakas, A., and Stournaras, C. (2005). LIM-kinase 2 and Cofilin Phosphorylation Mediate Actin Cytoskeleton Reorganization Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 280, 11448–11457.

- Vega, S., Morales, A.V., Ocaña, O.H., Valdés, F., Fabregat, I., and Nieto, M.A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* *18*, 1131–1143.
- Verrier, S., Hogan, A., McKie, N., and Horton, M. (2004). ADAM gene expression and regulation during human osteoclast formation. *Bone* *35*, 34–46.
- Vincent, T., Neve, E.P.A., Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., et al. (2009). A SNAIL1–SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- $\beta$  mediated epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* *11*, 943–950.
- Wang, L., Lee, J.-F., Lin, C.-Y., and Lee, M.-J. (2008). Rho GTPases mediated integrin  $\alpha\beta 3$  activation in sphingosine-1-phosphate stimulated chemotaxis of endothelial cells. *Histochem. Cell Biol.* *129*, 579–588.
- Wang, X., Chow, F.L., Oka, T., Hao, L., Lopez-Campistrous, A., Kelly, S., Cooper, S., Odenbach, J., Finegan, B.A., Schulz, R., et al. (2009a). Matrix Metalloproteinase-7 and ADAM-12 (a Disintegrin and Metalloproteinase-12) Define a Signaling Axis in Agonist-Induced Hypertension and Cardiac Hypertrophy. *Circulation* *119*, 2480–2489.
- Wang, X., Oka, T., Chow, F.L., Cooper, S.B., Odenbach, J., Lopaschuk, G.D., Kassiri, Z., and Fernandez-Patron, C. (2009b). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ –Converting Enzyme Is a Key Regulator of Agonist-Induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. *Hypertension* *54*, 575–582.
- Wang, Y., Ngo, V.N., Marani, M., Yang, Y., Wright, G., Staudt, L.M., and Downward, J. (2010). Critical role for transcriptional repressor Snail2 in transformation by oncogenic RAS in colorectal carcinoma cells. *Oncogene* *29*, 4658–4670.
- Warzecha, C.C., and Carstens, R.P. (2012). Complex changes in alternative pre-mRNA splicing play a central role in the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). *Semin. Cancer Biol.* *22*, 417–427.
- Warzecha, C.C., Sato, T.K., Nabet, B., Hogenesch, J.B., and Carstens, R.P. (2009). ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell type-specific regulators of FGFR2 splicing. *Mol. Cell* *33*, 591–601.
- Ween, M.P., Oehler, M.K., and Ricciardelli, C. (2012). Transforming Growth Factor-Beta-Induced Protein (TGFB1)/( $\beta$ ig-H3): A Matrix Protein with Dual Functions in Ovarian Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *13*, 10461–10477.
- Wen, G., Partridge, M.A., Li, B., Hong, M., Liao, W., Cheng, S.K., Calaf, G.M., Zhou, J., Zhang, Z., Shah, A., et al. (2011). TGFB1 Expression Reduces In Vitro and In Vivo Metastatic Potential of Lung and Breast Tumor Cells. *Cancer Lett.* *308*, 23–32.
- WEN, G., HONG, M., LI, B., LIAO, W., CHENG, S.K., HU, B., CALAF, G.M., LU, P., PARTRIDGE, M.A., TONG, J., et al. (2011). Transforming growth factor- $\beta$ -induced protein (TGFB1) suppresses mesothelioma progression through the Akt/mTOR pathway. *Int. J. Oncol.* *39*, 1001–1009.
- Wendt, M.K., Allington, T.M., and Schiemann, W.P. (2009). Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol. Lond. Engl.* *5*, 1145–1168.

- Wewer, U.M., Mörgelin, M., Holck, P., Jacobsen, J., Lydolph, M.C., Johnsen, A.H., Kveiborg, M., and Albrechtsen, R. (2006). ADAM12 Is a Four-leafed Clover THE EXCISED PRODOMAIN REMAINS BOUND TO THE MATURE ENZYME. *J. Biol. Chem.* *281*, 9418–9422.
- Wislet-Gendebien, S., Laudet, E., Neirinckx, V., and Rogister, B. (2012). Adult Bone Marrow: Which Stem Cells for Cellular Therapy Protocols in Neurodegenerative Disorders? *J. Biomed. Biotechnol.* *2012*.
- Wittchen, E.S., Worthylake, R.A., Kelly, P., Casey, P.J., Quilliam, L.A., and Burridge, K. (2005). Rap1 GTPase Inhibits Leukocyte Transmigration by Promoting Endothelial Barrier Function. *J. Biol. Chem.* *280*, 11675–11682.
- Xi, Q., Wang, Z., Zaromytidou, A.-I., Zhang, X.H.-F., Chow-Tsang, L.-F., Liu, J.X., Kim, H., Barlas, A., Manova-Todorova, K., Kaartinen, V., et al. (2011). A poised chromatin platform for TGF- $\beta$  access to master regulators. *Cell* *147*, 1511–1524.
- Xie, L., Law, B.K., Chytil, A.M., Brown, K.A., Aakre, M.E., and Moses, H.L. (2004). Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF- $\beta$ 1-Induced EMT In Vitro. *Neoplasia* *6*, 603–610.
- Xu, G.-P., Li, Q.-Q., Cao, X.-X., Chen, Q., Zhao, Z.-H., Diao, Z.-Q., and Xu, Z.-D. (2007). The effect of TGF- $\beta$ 1 and Smad7 gene transfer on the phenotypic changes of rat alveolar epithelial cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* *12*, 457–472.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* *19*, 156–172.
- Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y., and Fujisawa-Sehara, A. (1995). A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* *377*, 652–656.
- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y.E. (2008). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- $\beta$ . *Mol. Cell* *31*, 918–924.
- Yang, A.D., Fan, F., Camp, E.R., van Buren, G., Liu, W., Somcio, R., Gray, M.J., Cheng, H., Hoff, P.M., and Ellis, L.M. (2006a). Chronic Oxaliplatin Resistance Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cell Lines. *Clin. Cancer Res.* *12*, 4147–4153.
- Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., and Shang, Y. (2012). SET8 promotes epithelial–mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* *31*, 110–123.
- Yang, J., Wu, J., Guo, F., Wang, D., Chen, K., Li, J., Du, L., and Yin, A. (2014). Maternal Serum Disintegrin and Metalloprotease Protein-12 in Early Pregnancy as a Potential Marker of Adverse Pregnancy Outcomes. *PLoS ONE* *9*.
- Yang, M.-H., Hsu, D.S.-S., Wang, H.-W., Wang, H.-J., Lan, H.-Y., Yang, W.-H., Huang, C.-H., Kao, S.-Y., Tzeng, C.-H., Tai, S.-K., et al. (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* *12*, 982–992.

- Yang, X., Pursell, B., Lu, S., Chang, T.-K., and Mercurio, A.M. (2009). Regulation of  $\beta 4$ -integrin expression by epigenetic modifications in the mammary gland and during the epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 122, 2473–2480.
- Yang, Y., Pan, X., Lei, W., Wang, J., and Song, J. (2006b). Transforming growth factor- $\beta 1$  induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. *Oncogene* 25, 7235–7244.
- Yang, Z., Mu, Z., Dabovic, B., Jurukovski, V., Yu, D., Sung, J., Xiong, X., and Munger, J.S. (2007). Absence of integrin-mediated TGF $\beta 1$  activation in vivo recapitulates the phenotype of TGF $\beta 1$ -null mice. *J. Cell Biol.* 176, 787–793.
- Yi, J.Y., Shin, I., and Arteaga, C.L. (2005). Type I Transforming Growth Factor  $\beta$  Receptor Binds to and Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 10870–10876.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15–33.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14, 163–176.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yu, L., Hébert, M.C., and Zhang, Y.E. (2002). TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- $\beta$  responses. *EMBO J.* 21, 3749–3759.
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S.L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., et al. (2013). Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science* 339, 580–584.
- Yuan, P., Kadara, H., Behrens, C., Tang, X., Woods, D., Solis, L.M., Huang, J., Spinola, M., Dong, W., Yin, G., et al. (2010). Sex Determining Region Y-Box 2 (SOX2) Is a Potential Cell-Lineage Gene Highly Expressed in the Pathogenesis of Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *PLoS ONE* 5, e9112.
- Zammit, P.S., Partridge, T.A., and Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 1177–1191.
- Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N., and Böttinger, E.P. (2004). Integration of TGF- $\beta$ /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J.* 23, 1155–1165.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2007a). Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts. *Cancer Res.* 67, 10123–10128.

- Zeisberg, E.M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A.L., McMullen, J.R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., et al. (2007b). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* 13, 952–961.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S.E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2008). Fibroblasts in Kidney Fibrosis Emerge via Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *J. Am. Soc. Nephrol.* JASN 19, 2282–2287.
- Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., and Kalluri, R. (2003). BMP-7 counteracts TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat. Med.* 9, 964–968.
- Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M.B., Rieder, F., Tanjore, H., and Kalluri, R. (2007c). Fibroblasts Derive from Hepatocytes in Liver Fibrosis via Epithelial to Mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* 282, 23337–23347.
- Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19, 128–139.
- Zhang, L., Guo, W., Chen, Q., Fan, X., Zhang, Y., and Duan, E. (2009). Adam12 plays a role during uterine decidualization in mice. *Cell Tissue Res.* 338, 413–421.
- Zhao, Z., Gruszczynska-Biegala, J., Cheuvront, T., Yi, H., Mark, H. von der, Mark, K. von der, Kaufman, S.J., and Zolkiewska, A. (2004). Interaction of the disintegrin and cysteine-rich domains of ADAM12 with integrin  $\alpha$ 7 $\beta$ 1. *Exp. Cell Res.* 298, 28–37.
- Zhou, A.X., Hed, A. El, Mercer, F., Kozhaya, L., and Unutmaz, D. (2013). The Metalloprotease ADAM12 Regulates the Effector Function of Human Th17 Cells. *PLoS ONE* 8, e81146.
- Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.-C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation in control of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 6, 931–940.
- Zuo, W., and Chen, Y.-G. (2009). Specific Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors in Lipid Rafts Is Required for Epithelial Cell Plasticity. *Mol. Biol. Cell* 20, 1020–1029.



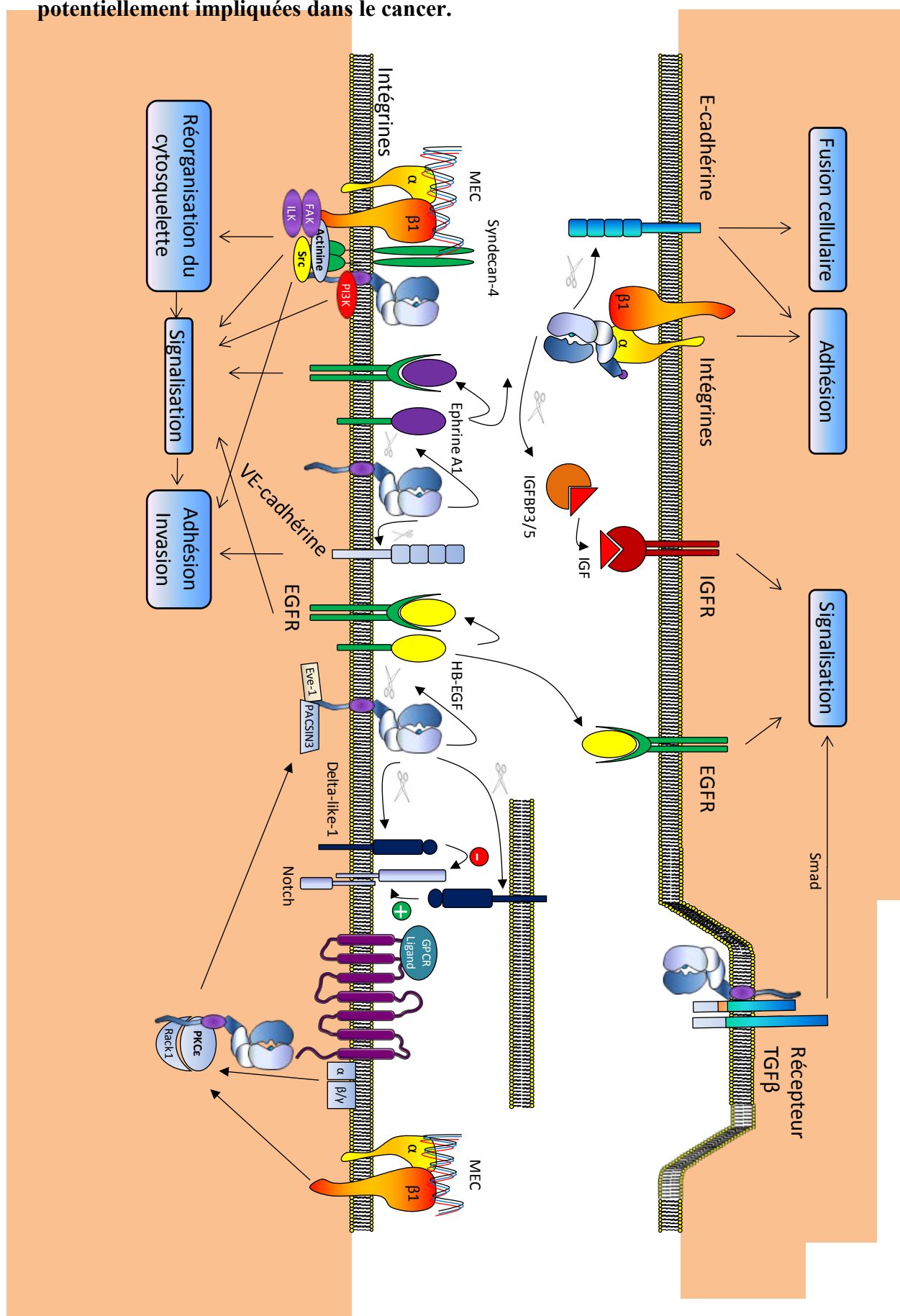
## ANNEXES

---





**Annexe 1 : Schéma non exhaustive des fonctions d'ADAM12L et d'ADAM12S potentiellement impliquées dans le cancer.**



**Annexe 2 : Liste des protéines avec un enrichissement supérieur ou égale à 3 dans les immunoprécipitats ADAM12L comparativement au contrôle dans les MCF10A surexprimant ADAM12L.**

Symbole Gene	Identified Proteins (258/259)	Fold Change	IP ADAM12L	IP IgG	Score Crapome /411
ADAM12	Metalloprotease-disintegrin 12 transmembrane isoform La OS=Homo sapiens GN=ADAM12 PE=1 SV=1	INF	91	0	0
Raichu404X	Raichu404X OS=Homo sapiens GN=Raichu404X PE=2 SV=1	INF	28	0	0
USP25	Isoform USP25m of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25 OS=Homo sapiens GN=USP25	INF	27	0	0
EIF4G1	EIF4G1 protein OS=Homo sapiens GN=EIF4G1 PE=2 SV=1	INF	26	0	102
TJP2	Tight junction protein 2 (Zona occludens 2), isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=TJP2 PE=4 SV=1	INF	23	0	32
UBC	Polyubiquitin-C (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBC PE=4 SV=1	INF	16	0	233
AP2A1	Isoform B of AP-2 complex subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=AP2A1	INF	15	0	24
DDX5	cDNA FLJ53366, highly similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 (EC 3.6.1.-) OS=Homo sapiens GN=DDX5	INF	13	0	247
RPS14	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=3	INF	12	0	259
TBC1D15	Isoform 2 of TBC1 domain family member 15 OS=Homo sapiens GN=TBC1D15	INF	11	0	23
RARS	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=RARS PE=1 SV=2	INF	10	0	110
DDOST	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DDOST	INF	10	0	59
RPS15A	HCG1994130, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=hCG_1994130 PE=2 SV=1	INF	10	0	178
PLEKHA5	Pleckstrin homology domain containing, family A member 5, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=PLEKHA5	INF	10	0	13
AFG3L2	AFG3-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=AFG3L2 PE=1 SV=2	INF	9	0	21
HADHA	Epididymis tissue sperm binding protein Li 14m OS=Homo sapiens GN=HADHA	INF	9	0	72
ATP5O	ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5O PE=1 SV=1	INF	8	0	51
F2	cDNA FLJ54622, highly similar to Prothrombin (EC 3.4.21.5) OS=Homo sapiens GN=F2	INF	8	0	16
CYTSA	CYTSA protein OS=Homo sapiens GN=CYTSA PE=2 SV=1	INF	8	0	
LRRFIP1	Isoform 2 of Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1 OS=Homo sapiens GN=LRRFIP1	INF	8	0	50
ALDH18A1	Isoform Short of Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens GN=ALDH18A1	INF	8	0	93
ATAD3A	ATPase family AAA domain-containing protein 3A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATAD3A	INF	7	0	87
C4B	Complement C4-B OS=Homo sapiens GN=C4B PE=1 SV=2	INF	7	0	40
RPL14	60S ribosomal protein L14 OS=Homo sapiens GN=RPL14 PE=1 SV=4	INF	6	0	156
AHCY	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens GN=AHCY PE=1 SV=4	INF	6	0	98
TJP1	Tight junction protein ZO-1 OS=Homo sapiens GN=TJP1 PE=4 SV=1	INF	6	0	35
MYO1C	Unconventional myosin-Ic OS=Homo sapiens GN=MYO1C PE=1 SV=1	INF	6	0	66
RPS27	40S ribosomal protein S27 OS=Homo sapiens GN=LOC392748 PE=3 SV=1	INF	5	0	185
HNRNPNU	cDNA FLJ4920 fis, clone BRAMY3011501, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPNU	INF	5	0	280
TARS	cDNA, FLJ96812, highly similar to Homo sapiens threonyl-tRNA synthetase (TARS), mRNA OS=Homo sapiens GN=TARS	INF	5	0	65
C5	Complement C5 OS=Homo sapiens GN=C5 PE=1 SV=4	INF	5	0	20
RPS26	HCG20716 OS=Homo sapiens GN=RPS26 PE=4 SV=1	INF	5	0	157
DDX21	Isoform 2 of Nucleolar RNA helicase 2 OS=Homo sapiens GN=DDX21	INF	5	0	179
PRDX5	Isoform 3 of Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX5	INF	5	0	26
ZC3H14	Isoform 4 of Zinc finger CCCH domain-containing protein 14 OS=Homo sapiens GN=ZC3H14	INF	5	0	42
DOCK10	sp Q96BY6 DOCK10_HUMAN-DECOY Dedicator of cytokinesis protein 10 OS=Homo sapiens GN=DOCK10	INF	5	0	1
RPL6	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=2 SV=1	INF	4	0	172
AP1G1	cDNA FLJ46199 fis, clone TEST14007965, highly similar to AP-1 complex subunit gamma-1 OS=Homo sapiens GN=AP1G1	INF	4	0	4
NUP205	cDNA FLJ50996, highly similar to 60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=NUP205	INF	4	0	37
PGAM5	Isoform 2 of Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PGAM5	INF	4	0	73
CIT	Isoform 4 of Citron Rho-interacting kinase OS=Homo sapiens GN=CIT	INF	4	0	9
RPS9	Ribosomal protein S9, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=RPS9 PE=3 SV=1	INF	4	0	170
EWSR1	RNA-binding protein EWS OS=Homo sapiens GN=EWSR1 PE=1 SV=1	INF	4	0	143
RPL23A	60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens GN=RPL23A PE=1 SV=1	INF	3	0	224
RNPEP	Aminopeptidase B OS=Homo sapiens GN=RNPEP PE=1 SV=1	INF	3	0	10
DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens GN=DDX3X PE=2 SV=1	INF	3	0	212
CFL1	cDNA FLJ51435, moderately similar to Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1	INF	3	0	196
NPEPPS	cDNA FLJ56108, highly similar to Puromycin-sensitive aminopeptidase (EC 3.4.11.-) OS=Homo sapiens GN=NPEPPS	INF	3	0	34
GMPS	cDNA FLJ57604, highly similar to GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) (EC 6.3.5.2) OS=Homo sapiens GN=GMPS	INF	3	0	58
HADH	cDNA, FLJ95242, highly similar to Homo sapiens L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADH	INF	3	0	27
COPB1	Coatomer subunit beta OS=Homo sapiens GN=COPB1 PE=1 SV=3	INF	3	0	92
MCM6	DNA replication licensing factor MCM6 OS=Homo sapiens GN=MCM6 PE=1 SV=1	INF	3	0	101

Symbole Gene	Identified Proteins (258/259)	Fold Change	IP ADAM12L	IP IgG	Score Crapome /411
HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Homo sapiens GN=HYOU1 PE=4 SV=1	INF	3	0	50
NUMA1	Isoform Numa-m of Nuclear mitotic apparatus protein 1 OS=Homo sapiens GN=NUMA1	INF	3	0	78
MUC19	MUC19 variant 12 OS=Homo sapiens GN=MUC19 PE=2 SV=1	INF	3	0	
PDE6H	Retinal cone rhodopsin-sensitive cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit gamma OS=Homo sapiens GN=PDE6H	INF	3	0	0
VPS35	Vacuolar protein sorting 35 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	INF	3	0	35
RPS2	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=1	INF	2	0	210
RPS8	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=2 SV=1	INF	2	0	228
ITPR3	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 OS=Homo sapiens GN=ITPR3 PE=1 SV=2	INF	2	0	15
PFKP	Isoform 2 of ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type OS=Homo sapiens GN=PFKP	INF	2	0	75
LONP1	Lon protease homolog, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=LONP1 PE=2 SV=1	INF	2	0	73
MIA3	Melanoma inhibitory activity protein 3 OS=Homo sapiens GN=MIA3 PE=1 SV=1	INF	2	0	16
MYO1B	MYO1B variant protein OS=Homo sapiens GN=MYO1B PE=2 SV=1	INF	2	0	69
NFAT5	Nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=NFAT5	INF	2	0	5
NUP205	Nuclear pore complex protein Nup205 OS=Homo sapiens GN=NUP205 PE=1 SV=3	INF	2	0	37
SYNE2	Polytrophin OS=Homo sapiens GN=TROPH PE=2 SV=1	INF	2	0	10
DDX17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 OS=Homo sapiens GN=DDX17 PE=1 SV=1	INF	2	0	238
RPS11	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens GN=RPS11 PE=1 SV=1	15	19	1	151
SLC25A5	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7	7,3	18	2	223
HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM PE=4 SV=1	7,3	9	1	220
EIF4A1	cDNA FLJ78244, highly similar to Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=EIF4A1	6,9	17	2	190
IQGAP1	HCG1991735, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=HCG_1991735 PE=4 SV=1	6,5	8	1	95
RPS20	Isoform 2 of 40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20	6,5	8	1	179
TGFB1	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 OS=Homo sapiens GN=TGFB1 PE=1 SV=1	5,7	14	2	1
RPL22	60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=1	5,7	7	1	192
IGKC	Ig kappa chain C region OS=Homo sapiens GN=IGKC PE=4 SV=1	4,9	6	1	
PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form OS=Homo sapiens GN=PYGB PE=1 SV=5	4,5	28	5	19
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1, isoform CRA_a OS=Homo sapiens GN=SERPINA1	4,5	11	2	2
TAGLN2	Transgelin-2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=1	4,5	11	2	156
ARPC4	Isoform 3 of Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=ARPC4	4,1	10	2	39
PABPC1	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=PABPC1 PE=4 SV=1	4,1	10	2	172
PDCD6IP	Dopamine receptor interacting protein 4 OS=Homo sapiens GN=DRIP4 PE=2 SV=1	4,1	5	1	55
IgG	IgG L chain OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3,7	60	13	
ITGB4	Integrin beta OS=Homo sapiens GN=ITGB4 PE=3 SV=1	3,7	9	2	0
RPL27	60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3,2	8	2	159
RPL11	Cell growth-inhibiting protein 34 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	3,2	8	2	209
RAB1B	Ras-related protein Rab-1B OS=Homo sapiens GN=RAB1B PE=4 SV=1	3,2	8	2	69
RPL23	Ribosomal protein L23, isoform CRA_b OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=3 SV=1	3,2	8	2	243
KRT81	Keratin, type II cuticular Hb1 OS=Homo sapiens GN=KRT81 PE=4 SV=1	3,2	4	1	40
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PPIB PE=1 SV=2	3,2	4	1	119
PRIC295	Peroxisome proliferator activated receptor interacting complex protein OS=Homo sapiens GN=PRIC295	3,2	4	1	104
LMNA	Isoform C of Prelamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA	3,1	42	11	92
TUBA4A	Isoform 2 of Tubulin alpha-4A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA4A	3	6	2	377

### **Annexe 3 : Autres activités réalisées durant la thèse.**

#### **Communications Orales :**

- Congrès de la Société Française de la Matrice ExtraCellulaire, Limoges, FRANCE (Avril 2014). Obtention d'une bourse de mobilité.
- 2<sup>e</sup> journée des jeunes chercheurs de l'institut IRSET, Rennes, FRANCE (Décembre 2013).

#### **Communications par Poster :**

- Congrès Biologie du cancer : Microenvironnement, Métastases et Thérapies, Cold Spring Harbor, USA (Mai 2015).
- 14<sup>e</sup> Congrès FEBS EMBO, Paris, FRANCE (Septembre 2014).  
Obtention d'une bourse de mobilité.
- 1<sup>ère</sup> et 3<sup>e</sup> journées des jeunes chercheurs de l'institut IRSET, Rennes, FRANCE (Décembre 2012 et Décembre 2014).
- 3<sup>e</sup> journée des jeunes chercheurs de Bretagne, Brest, FRANCE (Juin 2013).

#### **Missions d'enseignement :**

- 2013-2014 : 64H de TD/TP en Microbiologie à l'UFR SVE de l'Université de Rennes1.
- 2012-2013 : 64H de TD/TP en Biologie Cellulaire à l'UFR SVE de l'Université de Rennes1.

#### **Encadrements :**

- Avril 2015 - Juin 2015 : Encadrement d'un stagiaire de 2<sup>e</sup> année de DUT de Quimper, Morgan Pichaud.
- Avril 2014 - Juin 2014 : Encadrement d'un stagiaire de Licence 3 de Rennes, Grégoire Bouillon.
- Janvier 2013 - Juin 2013 : Encadrement d'une stagiaire de Master 2 de Rennes, Fabienne Le Cann.

#### **Membre du bureau de l'UPSET, club de doctorants et post-doctorants de l'IRSET**

- Participation à l'organisation de la 2<sup>e</sup> journée des jeunes chercheurs de l'IRSET (Décembre 2013).
- Invitation d'un orateur extérieur à Rennes dans le cadre de cette journée.

**Formations doctorales :**

- Visite des entreprises Hemarina et Manros Therapeutics à Morlaix et Roscoff (juin 2013).
- Conférence "How to write a great paper?" par ELSEVIER (mai 2013).
- Science en Cour[t] : Vulgarisation Scientifique sous la forme d'un court métrage de 5 minutes. Diffusion à l'occasion du festival Science en Cour[t] (Avril 2013).

## **ANNEXE 4**

VU :

VU :

**Le Directeur de Thèse  
Doctorale**  
(Nom et Prénom)

**Le Responsable de l'École**

**VU pour autorisation de soutenance**

**Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy CATHELINEAU**

**VU après soutenance pour autorisation de publication :**

**Le Président de Jury,**  
(Nom et Prénom)



### **Rôle d'ADAM12 dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse**

Les échanges entre les cellules tumorales et le microenvironnement jouent un rôle essentiel dans le développement des tumeurs. Dans ce contexte, la nouvelle famille de métalloprotéases, les protéines ADAM, constituent aujourd'hui des régulateurs majeurs de la progression tumorale en agissant sur la biodisponibilité des médiateurs de la communication cellulaire que sont les cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Au sein de cette famille, ADAM12 est la plus associée au cancer. Elle possède la particularité de jouer un rôle dans la signalisation cellulaire, de façon indépendante de son activité métalloprotéase, notamment dans les voies de signalisation du TGF $\beta$ . Notre étude montre pour la première fois un rôle pour la forme membranaire d'ADAM12 dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), un processus essentiel à l'invasion tumorale dont le TGF $\beta$  est un inducteur majeur. Cet effet est médié par l'activation des voies de signalisation du TGF $\beta$ , impliquant les protéines SMAD3, AKT et ERK et requiert le domaine cytoplasmique d'ADAM12L mais pas son domaine catalytique. L'activation de ces voies de signalisation pourrait impliquer une relocalisation d'ADAM12L au sein de plates-formes de signalisation dans les radeaux lipidiques. Par ailleurs, nous avons montré qu'ADAM12L interagit avec les protéines ZO-1 et ZO-2, des protéines des jonctions serrées, et pourrait favoriser leur désassemblage au cours de l'EMT. Nos travaux ont permis de mettre en évidence une nouvelle fonction pour ADAM12L dans l'EMT, par un mécanisme impliquant une modulation des signaux régulant ce processus. Une meilleure compréhension de la dynamique de ces mécanismes moléculaires pourrait permettre de développer de nouvelles thérapies ciblées pour lutter contre la progression tumorale.

**Mots clés : ADAM12, Transition Epithélio-Mésenchymateuse, TGF $\beta$ , ERK, Radeaux lipidiques, ZO.**

Communication between tumoral cells and the microenvironment plays an essential role in the development of tumors. In that context, the new family of metalloproteases, the ADAM proteins, are major regulators of the tumoral progression by acting on the bioavailability of important mediators of cellular communication as cytokines and growth factors. Among this family, ADAM12 is the most associated with cancer. It has been shown to mediate signaling pathways by a process independent of its metalloproteolysis activity, in particular for TGF $\beta$  signaling. This study shows for the first time a role for the membrane form of ADAM12 in the induction of epithelial to mesenchymal transition (EMT), an essential process involved in tumor invasion, where TGF $\beta$  is a main inducer. This effect is mediated by the activation of TGF $\beta$  signaling pathways, SMAD3, AKT and ERK and requires the cytoplasmic tail of ADAM12L but not its catalytic activity. Activation of these pathways could involve a relocalisation of ADAM12L in special signaling platform in lipid rafts. Moreover, we have shown that ADAM12L interacts with ZO-1 and ZO-2, two proteins of tight junctions, and could facilitate their disassembling during EMT. This work underscores for the first time a new function of ADAM12L in EMT, by a mechanism involving a modulation of signals regulating this process. A better understanding of the dynamic of these molecular mechanisms could allow the development of new targeted therapies to fight against tumoral progression.

**Key words ; ADAM12, Epithelial to Mesenchymal Transition, TGF $\beta$ , ERK, Lipid rafts, ZO.**